

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CONTROL DEL CRECIMIENTO DE *Vibrio cholerae* POR PRODUCTOS
NATURALES DE PLANTAS.

Por

Q.F.B. HERLINDA FABIOLA VENEGAS GARCIA

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación en Microbiología.

Septiembre, 2007

CONTROL DEL CRECIMIENTO DE *Vibrio cholerae* POR PRODUCTOS
NATURALES DE PLANTAS.

Comité de Tesis

Director de Tesis: Dra. Norma Laura Heredia Rojas

Secretario: M.C. Luisa Yolanda Solís Soto

Vocal: Dr. Jose Santos García Alvarado

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo que me brindó al otorgarme la beca número 191282 para realizar mis estudios de maestría.

Mi mas profundo agradecimiento a la Dra. Norma L. Heredia y al Dr. José Santos García, quienes me han recibido y me brindaron su aceptación y apoyo para realizar la presente investigación en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos a su cargo.

Una mención especial de agradecimiento a mis compañeros y maestros de laboratorio, porque con ustedes pase la mayor parte del tiempo aquí en Monterrey M.C. Julio Limón, Alma Solís, M.C. Luisa Solís, Biol. Esteban Maldonado, Israel Reyes, Suleida Guerrero, Brenda del Ángel Torres, Aldo Gpe. Galván, Ángela Aguilar, Q.F.B. Alejandra Morales, Carolina Arellano, Rocío Amador, Sagrario García, Rodolfo Perez, Berenice Valles, M.C. Guadalupe Rojas, Q.B.P. Sandra Castillo, Q.F.B. Rosa Ma. Casillas, Q.F.B. Diana Valtierra, Q.F.B. Emilio Carranza, Q.F.B. Alejandrina Montes, , Q.B.P. Ismael Malgón y M.C. Eduardo Sánchez quienes por su calidez humana y en mayor o menor grado compartieron conmigo esta etapa de estudios y trabajo en el laboratorio y han contribuido a mi crecimiento profesional y personal.

A mis viejos y siempre amigos de licenciatura Q.F.B. Claudia Delgado, Q.F.B. Luis F. Arias, Q.F.B. Carlos Pérez, Q.F.B. Icela Cisneros, Q.F.B. Mayra Verber, Q.I. Luis A. Rivera porque a pesar de la distancia nuestra amistad perdura. Al Q.F.B. Juan Manuel Rivero porque en su laboratorio mi interés por el conocimiento se incrementó.

Por lo que fue y no puedo ser...

Mil gracias.

DEDICATORIA

A mi fuente de inspiración, Julio; porque no me permitiste desistir de mi meta y me alentaste a seguir adelante. Ahora juntos vamos buscando nuevas metas que culminar.
Gracias por compartir tu vida conmigo.

A ti mi pequeño(a) limoncito, porque el día en que estés aquí con nosotros iniciará el descubrimiento mas grande que pueda hacer en toda mi vida.
Por ti, seré mejor de lo que soy.

A ti mamá gracias por haber hecho de mi la mujer que soy, gracias por todas las cosas, porque me mostraste el amor, por tus sacrificios, porque comprendiste todas las veces que no pude estar con ustedes, porque me siento orgullosa de ser tu hija.

A ti papa, gracias por tu paciencia y consejos que me ayudaron a tomar decisiones.
Porque eres mi ejemplo a seguir.

A mis hermanos Paco y Chuy porque a pesar que me perdí sus cumpleaños, siempre estuvieron ahí para darme un abrazo.

A mi sobrina Ana Lee por llenarme de amor, risas y abrazos cuando estabas conmigo.

A mis tías, Pile, Alma y Pancha por sus sabios consejos y apoyo cuando lo necesité.

A mi familia política Don Luis, Doña Catalina, José Luis, Adriana, Guadalupe, Karen, Axel, Alexis, Juany, Gabriel, Carolina, Ileana y Arturo por su cariño y apoyo y sobre todo abirme los brazos al entrar a su familia.

A ti Dios, porque volví a tomarte de la mano.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
TABLA DE CONTENIDO.....	v
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCION.....	15
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVO GENERAL.....	20
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
7. ANTECEDENTES.....	22
7.1. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	22
7.2. Generalidades de <i>Vibrio</i>	24
7.2.1. Generalidades de <i>V. cholerae</i>	24
7.2.2. Historia de la Enfermedad del cólera.....	28

7.2.3. Enterotoxina de <i>V. cholerae</i>	32
7.3. Plantas medicinales.....	36
7.3.1. Generalidades de plantas.....	36
7.3.2. Efecto de extractos de plantas sobre la inhibición del crecimiento de microorganismos.....	39
7.3.3. Efecto de Extractos sobre la producción de toxinas por microorganismos.....	42
7.3.4. Efecto de Mezclas de Extractos de Plantas sobre la inhibición del crecimiento de microorganismos.....	43
8. MÉTODOS.....	46
8.1. Cepas a utilizar.....	46
8.1.1. Activación de cepas.....	46
8.2. Plantas medicinales.....	47
8.2.1 Obtención de los extractos de plantas.....	47
8.3. Ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos.....	49
8.3.1. Ensayos preliminares.....	49
8.3.2. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (C.M.B.) de los extractos.....	49
8.3.3. Determinación del efecto inhibitorio del crecimiento por concentraciones subletales.....	50
8.3.4. Determinación del efecto inhibitorio del crecimiento de <i>V. cholerae</i> por las mezclas de extractos.....	50
8.3.5. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (C.M.B.) de las mezclas de extractos de plantas.....	51
8.4. Semipurificación de compuestos por Cromatografía líquida al vacío.....	53
8.5. Ensayos químicos preliminares para extractos de plantas.....	54
8.5.1. Hidrocarburos insaturados.....	54
8.5.2. Esteroles y saponinas.....	54
8.5.3. Flavonoides.....	55
8.5.4. Sesquiterpenlactonas.....	55
8.5.5. Carbohidratos.....	56
8.5.6. p-benzoquinonas.....	56
8.5.7. Alcaloides.....	56
8.5.8. Coumarinas.....	57
8.5.9. Alcoholes.....	57
8.5.10. Aldehídos y cetonas.....	58
8.5.11. Ésteres.....	58
8.5.12. Hidrocarburos aromáticos, éteres aromáticos y fenoles.....	58
8.5.13. Cloruros.....	59
8.5.14. Taninos.....	59
8.6. Diseño estadístico.....	60
9. RESULTADOS.....	68

9.1 Ensayos preliminares.....	68
9.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida de los extractos.....	72
9.3 Determinación del efecto inhibitorio del crecimiento por concentraciones subletales.....	73
9.4 Determinación del efecto inhibitorio del crecimiento de <i>V. cholerae</i> por las mezclas de extractos.....	77
9.5 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida de las mezclas de extractos de plantas.....	83
9.6 Semipurificación de compuestos por Cromatografía líquida al vacío (VLC).....	86
9.7 Determinación de los grupos químicos en los extractos de plantas.....	86
10. DISCUSION.....	89
11. CONCLUSION.....	94
12. LITERATURA CITADA.....	96
13. RESUMEN AUTOBIOGRAFICO.....	108

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Plantas utilizadas en el presente estudio.	48
2. Combinaciones utilizadas para evaluar el efecto de mezclas de extractos sobre el crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i>	52
3. Determinación del efecto inhibitorio de las plantas utilizadas y sus partes sobre el crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i>	69
4. Concentración Mínima Bactericida de extractos contra el crecimiento de <i>V. cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870) y <i>V. cholerae</i> O139 el Tor 1837. .72	72
5. Determinación de la C.M.B. de las mezclas de extractos de plantas y de los extractos individuales (<i>H. brasiletto</i> - <i>A. farneciana</i>) contra <i>V. cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).	83
6. Determinación de la C.M.B. de las mezclas de extractos de plantas y de los extractos individuales (<i>H. brasiletto</i> - <i>P. glandulosa</i>) contra <i>V. cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).	84
7. Determinación de la C.M.B. de las mezclas de extractos de plantas y de los extractos individuales (<i>H. brasiletto</i> - <i>P. fleuxicaule</i>) contra <i>V. cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).	84
8. Determinación de la C.M.B. de las mezclas de extractos de plantas y de los extractos individuales (<i>H. brasiletto</i> - <i>A. farneciana</i>) contra <i>V. cholerae</i> O139 El Tor 1837.	85
9. Determinación de la C.M.B. de las mezclas de extractos de plantas y de los extractos individuales (<i>H. brasiletto</i> - <i>P. glandulosa</i>) contra <i>V. cholerae</i> O139 El Tor 1837.	85

10. Determinación de la C.M.B. de las mezclas de extractos de plantas y de los extractos individuales (*H. brasiletto*- *P. fleuxicaule*) contra *V. cholerae* O139 El Tor 1837.86
11. Determinación de los compuestos químicos en los extractos crudos de las plantas estudiadas.87
12. Determinación de los compuestos químicos en los extractos semipurificados con la mezcla 9.5:0.5 (v/v) de Cloroformo:Metanol.89

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Clasificación de <i>V. cholerae</i>	25
2. Mecanismo de acción de la enterotoxina de <i>V. cholerae</i>	34
3. Resultados del ensayo preliminar con el método de difusión del extracto en pozo en agar con la cepa <i>V. cholerae</i> O1 Inaba clásica (ATCC 25870).	70
4. Resultados del ensayo preliminar con el método de difusión del extracto en pozo en agar con la cepa <i>V. cholerae</i> O1 Inaba clásica (ATCC 25870).	71
5. Efecto de concentraciones subletales (25%,50% y 75%) de la C.M.B. del extracto de <i>H. brasiletto</i> (Palo de brasil) contra el crecimiento de <i>V. cholerae</i> O139 El Tor 1837 y <i>V. cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).	73
6. Efecto de concentraciones subletales (25%, 50% y 75%) de la C.M.B. del extracto de <i>P. fleuxicaule</i> (Ébano) contra el crecimiento de <i>V. cholerae</i> O139 El Tor 1837 y <i>V. cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).	74
7. Efecto de concentraciones subletales (25%,50% y 75%) de la C.M.B. del extracto de <i>A. farnesiana</i> (Huizache) contra el crecimiento de <i>V. cholerae</i> O139 El Tor 1837 y <i>V. cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).	75
8. Efecto de concentraciones subletales (25%,50% y 75%) de la C.M.B. del extracto de <i>P. glandulosa</i> (Mezquite) contra el crecimiento de <i>V. cholerae</i> O139 El Tor 1837 y <i>V. cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).	76
9. Determinación del efecto de mezclas de extractos <i>H. brasiletto</i> - <i>A. farnesiana</i> sobre el crecimiento de <i>V. cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).	77
10. Determinación del efecto de mezclas de extractos <i>H. brasiletto</i> - <i>P. glandulosa</i> sobre el crecimiento de <i>V. cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).	78

11. Determinación del efecto de mezclas de extractos *H. brasiletto-P. fleuxicaule* sobre el crecimiento de *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).79
12. Determinación del efecto de mezclas de extractos *H. brasiletto-A. farnesiana* sobre el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837.80
13. Determinación del efecto de mezclas de extractos *H. brasiletto-P. glandulosa* sobre el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837.81
14. Determinación del efecto de mezclas de extractos *H. brasiletto-P. fleuxicaule* sobre el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837.82

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

C.M.B.	Concentración Mínima Bactericida
°C	Grados Celsius
g	Gramo(s)
h	Hora(s)
L	Litro (s)
logUFC/mL	Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro
<	Menor que
μ	Micra(s)
μm	Micrometro(s)
μl	Microlitro(s)
mL	Mililitro(s)
mg	miligramo(s)
mg/mL	miligramo por mililitro(s)
M	Molaridad
N	Normalidad
-	Negativo
+	Positivo
pH	Potencial de Hidrógeno
%	Porcentaje
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonia por mililitro
v/v	Volumen/Volumen

RESUMEN

En el presente trabajo determinamos el efecto de extractos de plantas y mezclas de estas sobre la inhibición del crecimiento de *V. cholerae*. Realizamos extractos metanólicos de 4 plantas, determinamos su capacidad antimicrobiana mediante el método de difusión del pozo en agar contra *V. cholerae* O139 El Tor 1837 y *V. cholerae* O1 Inaba Clásica 569-B. Determinamos la (C.M.B.), a los extractos y a las mezclas, y el efecto en el crecimiento de concentraciones subletales. Las mezclas se hicieron combinando el 25% de la CMB de *H. brasiletto* con el 25, 50 y 75% de la CMB de los extractos restantes. Realizamos la semipurificación de los compuestos presentes en los extractos individuales tanto en las mezclas. Encontramos actividad antimicrobiana por los extractos de plantas *Haematoxylon brasiletto*, *Pithecellobium fleuxicaule*, *Prosopis glandulosa* y *Acacia farnesiana*. Las CMB determinadas (en mg/mL) para *V. cholerae* fueron de *H. brasiletto* 0.6 ± 0.2 y *P. fleuxicaule* 15 ± 0.89 ; para *V. cholerae* O1 Inaba Clásica 569-B la CMB de *P. glandulosa* fue 7.4 ± 1.2 y *A. farnesiana* 7.3 ± 2.88 ; contra *V. cholerae* O139 El Tor 1837 *P. glandulosa* tuvo CMB de 10 ± 0.89 y *A. farnesiana* 5.17 ± 0.41 . Observamos en el efecto subinhibitorio de la CMB disminución en el crecimiento bacteriano en las concentraciones utilizadas de acuerdo a la planta. Las mezclas con mejor actividad fueron las que se mezclaron el 25%:75% y 25%:50% de *H. brasiletto*:*P. fleuxicaule*, así como el 25%:75% de la mezcla *H. brasiletto*: *P. glandulosa*. En la semipurificación de compuestos se encontró mejor actividad en las fracciones separadas con los solventes de Cloroformo:Metanol 9.5:0.5 (v/v). Los compuestos químicos encontrados en los extractos y las mezclas, fueron en su mayoría flavonoides, coumarinas, carbohidratos, p-benzoquinonas, cloruros, taninos, aldehídos y cetonas. Los extractos mostraron efecto bactericida contra las cepas de *V. cholerae*. Las combinaciones *H. brasiletto*, *P. fleuxicaule* y *H. brasiletto*- *P. glandulosa* mostraron un efecto sinérgico en la eliminación del crecimiento.

ABSTRACT

Vibrio cholerae is a noninvasive gram negative bacterium that causes cholera, a devastating diarrheal disease which in its extreme manifestation is one of the most rapidly fatal illnesses known. Cholera is acquired by the ingestion of food or water contaminated with the stools of an infected individual. The microorganism has killed millions of people and continues to be a major health problem worldwide. The requirement of new, effective and accessible medicines, the development of multiantibiotic resistance in bacteria as well as the development of natural food preservatives, have induced the study of plants as alternatives for active antimicrobial compounds. Here, the effect of plant extracts and mixtures of them on the growth of *V. cholerae* was determined. Methanolic extracts were obtained from 4 plants. Preliminary assays of the antimicrobial activity of the extracts and mixtures of them were determined using the well diffusion technique on agar against *V. cholerae* 1837 Ogawa 0139 and *V. cholerae* 569-B Inaba O1. The minimal bactericidal concentration (MBC) of the extracts was obtained. The effect of mixtures of the sub-inhibitory concentrations was also studied. Twenty five percent of the MBC of *Haematoxylon brasiletto* was mixed with 25, 50 or 75% of the MBC of extracts from *Pithecellobium fleuxicaule*, *Prosopis glandulosa* and *Acacia farnesiana*; results were analyzed with multiple comparison tests ($p < 0.05$). The extracts of *H. brasiletto*, *P. fleuxicaule*, *P. glandulosa* and *A. farnesiana* produced inhibition zones of 24 - 30mm in diameter for both strains of *V. cholerae*. The MBC (mg/ml) for both *V. cholerae* strains were *H. brasiletto* 0.6 ± 0.2 , and *P. fleuxicaule* 15 ± 0.9 ; for *V. cholerae* 569-B O1 Inaba the MBC of *P. glandulosa* was 7.4 ± 1.2 and *A. farnesiana* 7.3 ± 2.9 . In the case of *V. cholerae* 1837 O139 the MBC of *P. glandulosa* was 10 ± 0.9 and *A. farnesiana* 5.2 ± 0.4 . Concentrations lower than the MBC reduced bacterial growth. When mixtures of the sub-inhibitory concentrations were used, in some cases a synergistic effect was observed. These medicinal plants are potential antimicrobial compounds that could be helpful to control this pathogen.

INTRODUCCIÓN

En México cerca de 4000 especies de plantas con flores tienen atributos medicinales. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo en solo 5 % de las plantas. Los antiguos pobladores de nuestro territorio desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo, debido a la riqueza cultural y étnica que alcanzaron; así pues, desde tiempos prehispánicos diferentes grupos étnicos han usado plantas con fines medicinales. De esta manera se ha tomado interés por realizar diversos análisis de las plantas tradicionalmente empleadas en la curación de patologías y se han iniciado numerosos ensayos clínicos para conocer su aplicación (Ocegueda *et al.*, 2005).

Las enfermedades transmitidas por alimentos son en su mayoría, de origen microbiológico y/o toxigénico, ocasionando graves brotes a nivel mundial. El cólera es una enfermedad intestinal aguda causada por el *Vibrio cholerae* O1 y O139, que se transmite al hombre por la ingesta de agua y alimentos contaminados por este microorganismo. La enfermedad se presenta en cualquier edad y se caracteriza por diarrea abundante y vomito que puede llegar a la deshidratación, la cual puede evolucionar hasta el choque hipovolémico y causar la muerte (Labeé y García, 2001).

Esta enfermedad ha causado ocho grandes epidemias en el mundo desde 1817 hasta la actualidad. La séptima pandemia se inicio en Indonesia en 1961 y se ha diseminado por todo el mundo. En 1991 se originó la octava pandemia en Perú para después diseminarse a todo el continente americano (Secretaria de Salud, 2001).

La finalidad de este proyecto fue analizar nuevas opciones procedentes de extractos de plantas medicinales y silvestres tales como *Haematoxylon brasiletto*, *Haematoxylon campechianum*, *Mimosa tenuiflora*, *Phytosellobium fleuxicaule*, *Acacia*

farneciana, *Artemisa* sp., *Cymbopogon citrotus*, *Locophora williamsi*, *Eucaliptus globulus*, *Shinus terebentifolia*, *Turnera difusa*, *Jatrofa dioica*, *Larrea tridentata*, *Oreganum vulgare*, *Majorana hortensis*, y seleccionamos aquellas que mostraron la mayor o mejor actividad sobre el crecimiento de *V. cholerae*, se determinó el efecto bactericida que ejercieron sobre el microorganismo y además, se estableció el efecto de mezclas entre extractos sobre el crecimiento de *V. cholerae*. Al mismo tiempo se semipurificó e identificó el o los componentes químicos presentes en los extractos y mezclas de extractos utilizados.

Es importante destacar que las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen un problema de salud pública en la población, particularmente en los países en vías de desarrollo, donde prevalecen condiciones de riesgo que determinan una mayor ocurrencia de las mismas en los distintos sectores de la sociedad y principalmente en el más desprotegido. Es por esto, nuestro interés por investigar nuevas sustancias capaces de inhibir el crecimiento de los agentes que generan enfermedades, las cuales pueden llegar a ser mortales o incluso producir grandes pérdidas millonarias a las industrias de alimentos en estos países.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Las plantas han desempeñado un papel destacado, como alimentos, fibras y medicinas en todo el mundo desde épocas milenarias. Muchas de ellas son ahora el centro de interés de los investigadores a nivel mundial son originarias del hemisferio occidental. La fitoterapia europea ha aprovechado las plantas de Norte y Sudamérica, y millones de personas se benefician con ellas ya que nuestro propio sistema médico no cuenta con los recursos para investigar, aunado a las dificultades para su comercialización (McCaleb. R., 2003).

La identificación de nuevas sustancias con actividad antimicrobiana y que pudieran ser utilizados en forma terapéutica como una alternativa a los antibióticos sintéticos utilizados actualmente, fortalecerá la amplia gama de medicamentos y preventivos existentes, permitiendo de esta manera mayor diversidad y disponibilidad a tratamientos de enfermedades causadas por estos microorganismos.

Se ha reportado una amplia diversidad de estudios basados en la actividad antimicrobiana de muchas plantas nativas, sin embargo se hace evidente centrar especial atención al estudio científico de sus beneficios.

Algo de gran importancia pero muy poco estudiado es la actividad sinérgica que puede tener una mezcla de plantas. Sin embargo, en forma empírica esto ha sido usado desde hace tiempo por la medicina tradicional, por lo que en este trabajo pretendemos investigar el efecto de mezclas de plantas y de esta manera validar científicamente su utilización.

JUSTIFICACIÓN

Debido al creciente desarrollo de resistencia bacteriana contra muchos de los antibióticos existentes, resulta de gran importancia el descubrimiento de sustancias capaces de mostrar efectos inhibitorios sobre el crecimiento y producción de toxinas en microorganismos de importancia en alimentos.

Desde tiempos remotos las plantas medicinales han representado una alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas las gastrointestinales, donde en ocasiones se han utilizado combinaciones de plantas. Aunque el efecto de algunas de ellas esta bien documentado, la utilización de mezclas de plantas es un campo que no se ha estudiado, por lo que observamos un área de oportunidad importante al determinar la existencia de efectos sinérgicos que pudieran potenciar la actividad antimicrobiana. Debido a lo anterior, resulta necesario realizar una investigación exhaustiva que muestre los posibles efectos que pueden tener los extractos de plantas y combinaciones entre ellos, sobre el crecimiento de bacterias de importancia en alimentos como lo es *V. cholerae*.

HIPÓTESIS

La combinación de extractos de plantas medicinales puede potenciar el efecto inhibitorio sobre el crecimiento en *V. cholerae*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de extractos de plantas y mezclas de ellos sobre la inhibición del crecimiento en *V. cholerae*, así como semipurificar y caracterizar parcialmente dichos extractos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar del efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento de *V. cholerae*.

Establecer si las mezclas de los extractos potencian la actividad inhibitoria en el crecimiento de *V. cholerae*.

Semipurificar por medio de cromatografía líquida al vacío los extractos y las mezclas con actividad inhibitoria.

Caracterizar parcialmente por medio de pruebas colorimétricas los extractos, las mezclas y las fracciones semipurificadas con actividad inhibitoria.

ANTECEDENTES

7.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) son síndromes originados por la ingestión de alimentos y/o agua, que contienen agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población (Labeé y García, 2001). Las ETA's representan en el contexto de la salud pública, una importancia cada vez mas grande por las implicaciones observadas que pueden tener y la poca vigilancia epidemiológica en nuestro país. Por un lado la ocurrencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad de los alimentos, y por otro el proceso de globalización del comercio indica la progresiva y urgente necesidad de que los programas de control de enfermedades desarrollen mecanismos eficientes de detección de los brotes que suelen ocurrir.

Las bacterias entéricas comprenden un grupo relativamente homogéneo, se caracterizan fenotípicamente porque son gram negativos, inmóviles o móviles por flagelación y aerobios facultativos. Entre las bacterias entéricas hay cepas patógenas para los humanos, animales y las plantas, así como otras cepas de importancia

industrial. Dada la importancia médica de las bacterias entéricas, se han aislado y caracterizado un gran número de ellas.

En la actualidad se ha estimado que las enfermedades producidas por *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter sp.*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Salmonella sp* causan alrededor de 3 millones de muertes al año en los países en vías de desarrollo.

En México el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica estima que se producen anualmente 257 millones de casos de gastroenteritis y que son originados por el consumo de alimentos. Se incluyen enfermedades tales como la amebiasis intestinal, fiebre tifoidea, giardiasis, intoxicación alimentaria bacteriana y paratifoidea entre otras (Fernández, 2000).

Es importante destacar que las ETA's han disminuido considerablemente en las ultimas décadas, sin embargo aun constituyen un problema de salud pública en la población, particularmente en los países en vías de desarrollo, donde prevalecen las condiciones de riesgo que determinan una mayor ocurrencia de las mismas en los distintos sectores de la sociedad. La prevención y control de éstas ha permitido su reducción como causa principal de mortalidad (Secretaría de Salud, 2001).

7.2 Generalidades de *Vibrio*

Las bacterias del género *Vibrio* son habitantes de ambientes marinos, por lo que pueden encontrarse en los alimentos frescos provenientes del mar. Son microorganismos con forma bacilar, gram negativos, anaerobios facultativos, miden de 1.5 a 2.5 μm de largo y 0.5 a 0.8 μm de ancho, se observan en forma de coma, a veces en forma de S o curvada, descarboxilan lisina, tienen una temperatura óptima de crecimiento de 37°C y son capaces de sobrevivir en una concentración salina de 3%. Son microorganismos capaces de transmitirse por alimentos principalmente marinos (camarones, ostras, etc.) así como a través de abastecimientos de agua utilizadas para el consumo humano o riego de hortalizas contaminada con heces fecales (Labbé y García, 2001).

El género *Vibrio* que pertenece a la familia *Vibrionaceae*, incluye 36 especies, 12 de las cuales son potencialmente patógenas para el hombre y dentro de ellas se encuentra *V. cholerae* (Labbé y Garccía, 2001).

7.2.1 Generalidades de *Vibrio cholerae*

Con base en su antígeno somático (O), actualmente se conocen 198 serogrupos de *V. cholerae*. Cada serogrupo se define por un suero monoespecífico; el *V. cholerae* O1 se define así ya que aglutina con el suero O1 mientras que a los 197 restantes serogrupos se les denomina como NO O1 (Secretaría de Salud, 2001).

V. cholerae se divide en dos biotipos: Clásico y El Tor, estos, a su vez se dividen en tres serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima (Figura1).

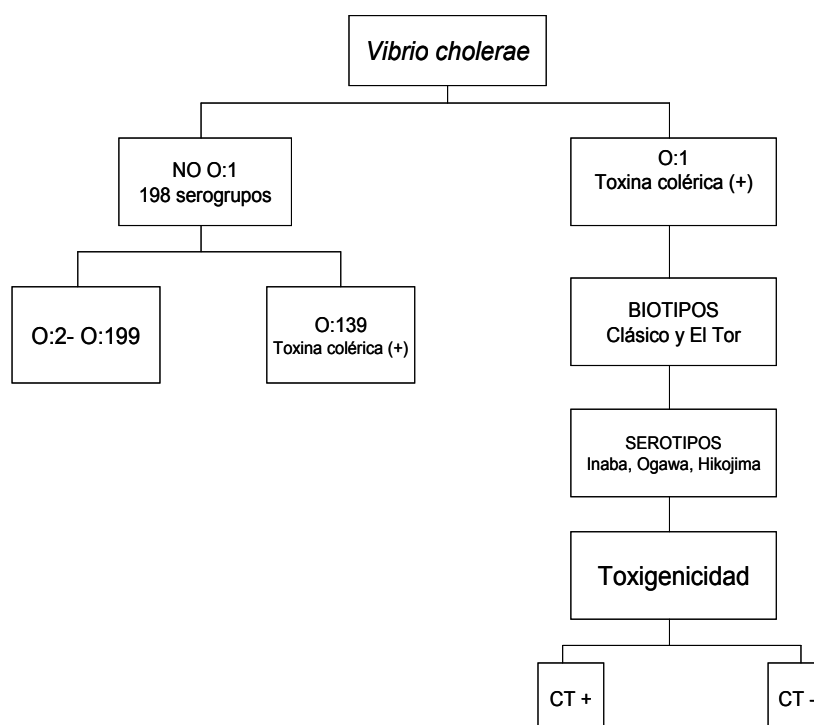


Figura 1. Clasificación de *V. cholerae*. (Secretaría de Salud, 2001).

Hasta 1992 el cólera era causado por cepas toxigénicas de *V. cholerae* O1, sin embargo; en ese mismo año, se presentó un brote de enfermedad diarreica aguda en una ciudad de India, que se asoció a cepas atípicas de *V. cholerae* que no pudieron ser identificados con ninguno de los grupos conocidos y tampoco aglutinaban con el suero O1 ni con otros sueros conocidos. Estudios posteriores revelaron que se trataba de un nuevo serotipo al que se designó como *V. cholerae* O139. Al igual que *V. cholerae* O1,

las cepas de *V. cholerae* O139 tienen los genes que regulan la expresión de varios factores de virulencia, así como la producción de toxinas; por lo que no es de asombro que sean capaces de producir el cólera epidémico (Secretaría de Salud, 2001). También se han observado diferencias entre estos dos grupos donde, *V. cholerae* O139 presenta una cápsula de polisacárido y distintos determinantes de virulencia del lipopolisacárido que no están presentes en *V. cholerae* O1 (Secretaría de Salud, 2001).

La enfermedad causada por *V. cholerae* O139 es indistinguible a la ocasionada por *V. cholerae* O1, así que debe ser manejada de igual forma. *V. cholerae* O139 es susceptible a tetraciclina aunque se ha reportado que es resistente a trimetoprim-sulfametoxazol y furazolidona (Secretaría de Salud, 2001).

Las cepas de *V. cholerae* NO O1 diferentes a las de *V. cholerae* O139, no tienen la capacidad de causar cólera y aunque se han encontrado algunas cepas que producen una gastroenteritis en adultos de leve a moderada, en muy raras ocasiones las cepas poseen las toxinas CT y Zot (altera la integridad de la membrana rompiendo las uniones de la mucosa celular). Una característica común de este grupo es la producción de una β -hemolisina que es causante de gastroenteritis (Fasano *et al*, 1991).

El cólera se considera como una enfermedad aguda gastrointestinal humana caracterizada por una profusa diarrea líquida, vómitos y calambres abdominales, provocando una rápida pérdida de fluidos corporales, los que conllevan a la deshidratación y shock hipovolémico. La infección generalmente es benigna que sin tratamiento adecuado puede ocurrir la muerte en pocas horas después de iniciados los

síntomas (Labbé y García, 2001). La enfermedad afecta principalmente a personas de bajo nivel socioeconómico, con higiene deficiente y que no disponen de servicios sanitarios adecuados (Secretaría de Salud, 2001).

En esta enfermedad el agente etiológico ingresa al organismo a través de la ingesta de agua y/o alimentos contaminados con heces y/o vómito de personas enfermas de cólera. *V. cholerae* requiere una dosis de inóculo de 10^6 microorganismos vivos para infectar al ser humano (Ray, 2003); un sujeto enfermo puede eliminar hasta 10^7 microorganismos por mL de evacuación y puede evacuar hasta 20 L en un día, lo que representa un enorme riesgo de contaminación potencial para las fuentes de agua como para los alimentos (Secretaría de Salud, 2001).

Desde los años 70's se han involucrado a diversos mariscos, en especial los moluscos bivalvos, como alimentos de riesgo para la adquisición de cólera si son consumidos crudos o inadecuadamente cocidos; así como un potencial infeccioso que tienen los vegetales irrigados con aguas negras y que son consumidos crudos (Secretaría de Salud, 2001).

En la valoración de un paciente con diarrea, deben investigarse los alimentos ingeridos recientemente y los viajes realizados en los últimos días. De esta manera *V. cholerae* se ha observado en pacientes que ingirieron ostras crudas, viajaron, o residieron en áreas en las que la enfermedad debida a este microorganismo era endémica (Henry, 2000).

La mayoría de las cepas de *V. cholerae* se consideraban susceptibles a los antibióticos comunes pero en 1977 aparecieron en Tanzania cepas multirresistentes a ampicilina, cloranfenicol y otros antimicrobianos. Después del primer reporte se presentaron brotes similares causados por cepas multirresistentes. En Ecuador se ha detectado hasta un 30% de cepas multirresistentes a cloranfenicol, doxiciclina y trimetoprim-sulfametoxazol. El último reporte sobre cepas multirresistentes en México de *V. cholerae* data de 1991 (Secretaría de Salud, 2001).

7.2.2 Historia de la enfermedad del cólera

A lo largo de la historia *V. cholerae* ha sido considerado como un microorganismo emergente, el cual ha causado ocho pandemias responsables de miles de defunciones (Secretaría de Salud, 2001).

La historia moderna del cólera se inicia en 1817 con la presencia de la primera pandemia, en ese año se presentó una violenta epidemia de cólera entre los colonizadores británicos, la enfermedad no solo acabó con los pobladores civiles, sino que también destrozó ejércitos enteros. De la India la enfermedad pasó a las naciones de la Península Arábiga, a través de soldados infectados provenientes de Bombay y que participaron en guerras locales. Las caravanas comerciales y los barcos mercantes hicieron el resto; presentándose mas tarde brotes en Egipto, Siria, Irak y Persia (Secretaría de Salud, 2001).

La ruta del padecimiento se extendió hacia el oriente, pasó por Ceylán, Birmania, China y en 1822 llegó al puerto de Nagasaki, mientras que los barcos con mercantes árabes llevaron la enfermedad a la costa oriental africana (Secretaría de Salud, 2001).

Al parecer el origen de la segunda pandemia (1829-1851) se ubicó en Astracán (Federación Rusa) donde en 1830 se presentó un gran brote, aunque es posible que el cólera hubiese llegado a tierras rusas procedente de India, Afganistán y Persia. Desde Rusia la enfermedad se extendió a Polonia, Finlandia, Berlín, Hamburgo y sur de Alemania. En París ocurrieron 98 casos donde fallecieron 96 personas (Secretaría de Salud, 2001).

La segunda pandemia llegó a tierras americanas en buques que transportaban inmigrantes europeos, posteriormente se detectó la presencia de brotes de cólera en Québec, Montreal, Nueva York y Filadelfia. La enfermedad pudo haber entrado a México a través de la frontera con Estados Unidos, por los barcos procedentes de Nueva Orleans o por los que llegaban a Yucatán provenientes de La Habana. Existen evidencias que el cólera se presentó por primera vez en la ciudad de Saltillo, Coahuila en el verano de 1833. Esta pandemia también afectó a otros países como Perú, Chile, Cuba, Nicaragua y Guatemala (Secretaría de Salud, 2001).

La tercer pandemia (1852-1859) ocasionada por *V. cholerae* fue una de las mas mortíferas en la historia ya que ocurrieron 140,000 muertes en Francia, 20,000 en Inglaterra y mas de 200,000 en México (Secretaría de Salud, 2001).

Durante la cuarta pandemia de cólera (1863-1879) se presentó un intenso brote entre los peregrinos que visitaban La Meca, los sobrevivientes diseminaron la enfermedad al volver a sus lugares de origen; viéndose afectadas las naciones de la cuenca mediterránea, así como; Alemania, Austria, Suecia, Gran Bretaña y África (Secretaría de Salud, 2001).

La quinta pandemia de cólera (1881-1896) tuvo lugar en India, Arabia y Egipto en donde ocasionó 58,000 defunciones en Alejandría. En esta ciudad y durante esta epidemia un grupo de investigadores dirigido por Robert Koch descubrieron el agente etiológico de la enfermedad (Secretaría de Salud, 2001).

En el transcurso de la sexta pandemia de cólera (1899-1923) en la estación de cuarentena El Tor en la península del Sinaí (Egipto) se aisló a *V. cholerae* variedad El Tor en el contenido intestinal de las personas convalecientes. En Europa como en Asia se registraron brotes aislados de cólera (Secretaría de Salud, 2001).

La séptima pandemia colérica se inició en la isla Sulawesi para luego extenderse a otras provincias de Indonesia. La enfermedad pasó a Hong Kong, Filipinas y Taiwan. Dos años después se presentaron brotes en Corea, Camboya, Tailandia, Singapur, Birmania y Bangladesh (Secretaría de Salud, 2001).

En 1970 se detectó su presencia en el oriente Africano y un año después en el occidente. En este continente se ha registrado hasta el 50% de letalidad por cólera. Para

1972 el cólera hizo presencia en Italia, Portugal, Checoslovaquia y Francia, los casos estuvieron asociados al consumo de mariscos crudos (Secretaría de Salud, 2001).

V. cholerae fue el agente causal de la pandemia de cólera presentada en 1991 en Perú, y en México se presentaron 2,690 casos distribuidos en 17 entidades federativas, donde ocurrieron 34 defunciones (Secretaría de Salud, 2001).

Para 1992 hubo 8,162 casos de cólera distribuidos en 28 estados de nuestro país; y se presentaron 92 defunciones (Secretaría de Salud, 1992).

La octava pandemia de cólera se presentó en agosto de 1993, en una ciudad de la India donde se observaron cientos de casos de una enfermedad diarreica aguda y deshidratante en pacientes adultos. Semanas después se presentaron casos en Madras y Bangladesh. Estudios microbiológicos aislaron al microorganismo en esos brotes siendo *V. cholerae* NO O1 el cual no podía serotipificarse con los 138 serotipos ya existentes. Posteriormente se determinó que esta bacteria poseía el gen que codifica la producción de toxina colérica (Secretaría de Salud, 2001). En ese mismo año, la Organización Mundial de la Salud emitió una recomendación en el sentido de considerar al cólera como un síndrome infeccioso que puede ser ocasionado por *V. cholerae* Clásico, El Tor y/o O139.

En México en 1993 se notificaron 11,091 casos en 26 entidades federativas, y se presentaron 198 defunciones (Secretaría de Salud, 1993). Un año después se presentaron

4,075 casos de cólera distribuidos en 21 estados y se reportaron 56 defunciones (Secretaría de Salud, 1994).

En 1995 debido a la epidemia del cólera en nuestro país ocurrieron 16,430 casos distribuidos en 27 entidades federativas y ocurrieron 142 defunciones (Secretaría de Salud, 1995).

En 1996 se reportaron 1,088 casos distribuidos en 14 estados de la República Mexicana y solo se presentaron 5 defunciones (Secretaría de Salud, 1996). En 1997 se presentaron 2,356 casos de cólera en 28 entidades federativas; se presentaron 18 defunciones (Secretaría de Salud, 1997) y en 1998 se reportaron 71 casos en 15 de los estados de la República Mexicana y no se presentaron defunciones (Secretaría de Salud, 1998).

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de México estimó en el 2000 un total de 0.01 casos por 100,000 habitantes, indicando con ello que en estos momentos el cólera ha sido controlado (Flores, 2003).

7.2.3. Enterotoxina de *V. cholerae*

El principal factor de virulencia de *V. cholerae* O1 es la toxina colérica (CT), la cual tiene como blanco ocasionar el incremento de la producción del AMP cíclico y provocar alteraciones en el transporte intracelular de iones, estimulando la secreción de cloruros

hacia la luz intestinal y disminuyendo la absorción de sodio hacia la célula. El acúmulo de ambos electrolitos provoca que el agua se desplace hacia la luz intestinal, donde el intestino grueso absorberá el volumen secretado, pero una vez que se sature la capacidad de transporte se presentará la clásica diarrea del cólera (Alarcón, 2002).

La producción de la CT debe ser verificada en el diagnóstico del cólera debido a que las cepas no toxigénicas de este microorganismo son comunes, especialmente en el ambiente. La CT es una proteína multimérica termolábil que consiste en una subunidad A y cinco subunidades B (Figura 2). Las subunidades B se unen a los gangliósidos (GM₁) en la superficie celular, permitiendo a la subunidad A el paso al interior de la célula. Una vez dentro, la subunidad A se disocia en dos péptidos (A1 y A2), donde el péptido A1 transfiere Adenosindifosfato ribosa (ADP-ribosa) del Dinucleótido de Adenina nicotinamida (NAD) a la subunidad α de la proteína Gs formando GsADP-ribosa en donde el Guanosin Trifosfato (GTP) no puede ser hidrolizado y la enzima permanece continuamente activada. La subunidad α ADP-ribosilada se disocia de las otras subunidades de la proteína Gs y activa el sistema adenilato ciclasa, el cual a su vez aumenta la concentración intracelular del Adeninmonofosfato cíclico (AMPc). Al encontrarse altos niveles de AMPc se activa la proteína quinasa. Lo que provoca alteración del transporte de los iones de Cloro y Sodio y el Agua, conduciendo a la diarrea, la pérdida de electrolitos y la deshidratación, síntomas característicos de la enfermedad del cólera (Alarcón, 2002).

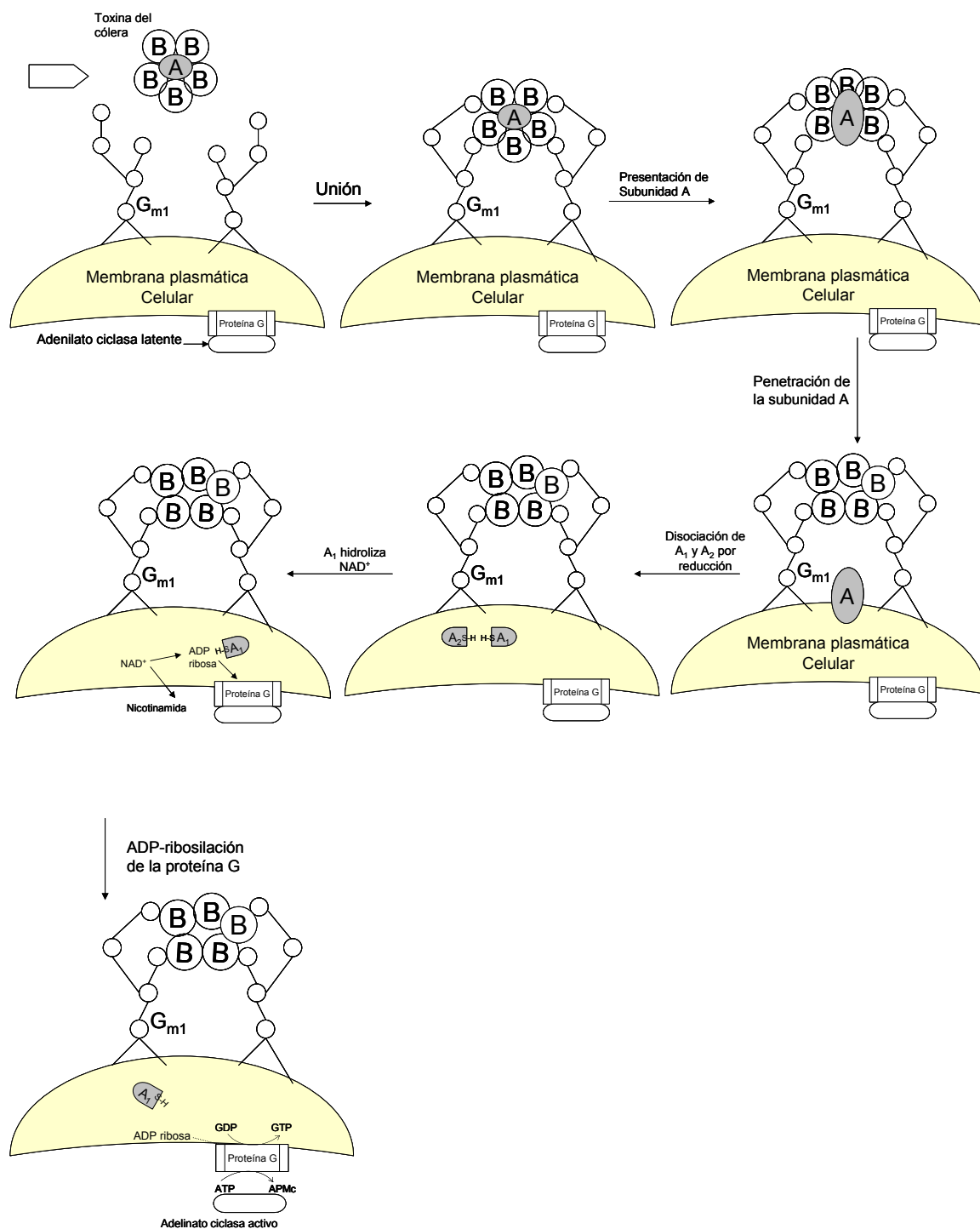


Figura 2. Mecanismo de acción de la enterotoxina de *V. cholerae* (Baron, 1996).

Aunque la toxina colérica es la más importante, algunas cepas producen otras toxinas como la Zot (zone occludens toxin) que rompe las uniones que mantiene unida la mucosa celular preservando la integridad de la membrana (Ketley, 1995). Otra enterotoxina encontrada mas recientemente es la toxina Ace (accessory cholera enterotoxin) que causa diarrea en animales pero no se conoce su papel en seres humanos (Trucksis *et al*, 1993).

El tratamiento recomendado para la enfermedad causada por *V. cholerae* es la reconstitución de líquidos y el restablecimiento del equilibrio electrolítico. Sin embargo, los antibióticos más utilizados en la actualidad son la gentamicina, doxiciclina, tetraciclinas, furazolidona, cloranfenicol y sulfametoxazol-trimetoprim, aunque existen reportes que indican la resistencia de *V. cholerae* a los últimos tres antibióticos mencionados (Secretaría de Salud, 2002).

El cólera es una enfermedad reemergente que a mas de diez años de haberse reintroducido al país (13 de junio de 1991) se encuentra en control epidemiológico (Secretaría de Salud, 2001). Aunque en los últimos años han sido pocas las notificaciones de casos de cólera, es importante considerar que en países como Guatemala y El Salvador, se tuvo conocimiento de importantes brotes y la ocurrencia de defunciones. Así mismo, se sabe que en Venezuela circulan cepas multirresistentes a antimicrobianos (Secretaría de Salud, 2001).

Sin embargo, como aun siguen presentándose casos aislados en algunas localidades del país, es necesario contar con acciones encaminadas a su prevención, atención de la

población infectada, desarrollo de nuevos productos para su tratamiento, innovación de estrategias efectivas y el redoblamiento de esfuerzos para mantener bajo control epidemiológico a la enfermedad. Sin olvidar que la enfermedad de cólera produce trastornos económicos a nuestro país, por la disminución en el ingreso de divisas extranjeras, principalmente por la exportación de alimentos tanto como la reducción del turismo extranjero. Por tanto, es importante tomar medidas de prevención, ya que existen amenazas que podrían hacer que la enfermedad resurja, como son el aumento en la pérdida de susceptibilidad a antimicrobianos, el paso o permanencia en el país de personas de origen centroamericano o provenientes de zonas con brotes epidémicos, la introducción al país de agua y/o alimentos marinos originarios de zonas endémicas de vibriones, entre otros (Secretaría de Salud, 2001).

7.3 Plantas medicinales

7.3.1 Generalidades de plantas

Las plantas han sido utilizadas por el hombre desde los tiempos más remotos, tanto para alimentarse como para curarse. El resurgimiento en occidente del interés del público y los científicos por la medicina natural tradicional, hace que el número de investigaciones realizadas en este campo haya aumentado notablemente en los últimos años. Desde hace varias décadas, los sistemas tradicionales de medicina han sido un tópico de importancia mundial. Actualmente, se estima que en muchos países en vías de

desarrollo, una gran parte de las poblaciones utilizan las prácticas tradicionales y plantas medicinales para cubrir las necesidades primarias como el cuidado de su salud. Aunque la medicina moderna esta disponible en estos países, la medicina tradicional a menudo mantiene su popularidad por razones culturales e históricas.

Una planta medicinal es aquella que contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidades terapéuticas o que son precursores para la hemisíntesis químico-farmacéutica (Cañigüeral y Vila, 2000). Las plantas medicinales han sido utilizadas tradicionalmente por cientos de años para combatir enfermedades tanto virales, como fúngicas y bacterianas. La mayoría de las civilizaciones han empleado las plantas medicinales para su curación siendo ésta en muchas ocasiones la única forma terapéutica existente hasta el siglo XVIII. A partir del siglo XIX se empezaron a aislar los primeros principios activos de las plantas, y desde entonces los científicos se han dedicado al estudio y la documentación de la información de las propiedades antimicrobianas de las plantas (McCaleb, 2003).

Como resultado de estos registros y estudios y apoyado por técnicas analíticas y de laboratorio se ha permitido conocer los principios activos y se ha aportado una base científica para explicar el porqué de algunas plantas empleadas tradicionalmente en la curación de enfermedades. Asimismo, la síntesis de estos compuestos ha facilitado la elaboración de fármacos eficaces y la aplicación de dosis precisas. De hecho, gran parte de los fármacos actuales derivan de compuestos procedentes de plantas medicinales (Ortega, 2002).

Los terpenos, que son compuestos comunes en las plantas tienen un origen biosintético común; están formados por la unión de dos o más unidades de isopreno, o bien existen como una variación de esta misma unidad. La forma completamente saturada de esta molécula de cinco carbonos es el isopentano, por lo que en términos generales se llaman terpenos a las sustancias que tiene una estructura secundaria isoterpenoide o isopentanoide (Valencia, 1995).

Con frecuencia se asocia la palabra terpeno con el término de aceites esenciales, con lo cual Goodwin sugirió que el número de los diferentes terpenos que se encuentran en las plantas, forman el grupo más grande de productos naturales reportados a la fecha (Goddwin, 1976).

Los aceites esenciales son sustancias líquidas, aromáticas y volátiles situadas en cualquier parte del vegetal conformadas por un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas. En general, estos se obtienen a través de una destilación en corriente de vapor la cual es una técnica demasiado costosa, siendo esto un inconveniente para su aislamiento. Se ha observado que los aceites esenciales inhiben con mayor efectividad a microorganismos gram positivos que a gram negativos.

7.3.2. Efecto de extractos de plantas sobre la inhibición del crecimiento de microorganismos

Las familias de las plantas más ricas en aceites esenciales son *Compositae* (Manzanilla), *Labiatae* (diferentes mentas), *Mirtaceae* (Eucalipto), *Pinaceae* (*Pinus*), *Roaseae* (Rosas), *Rutaceae* (limón) y *Umbeliferae* (anís, cominos, etc.) (Valencia, 1995).

Hernández (2001) evaluó la actividad de los aceites esenciales de *O. basilicum* L. y *O. tenuiflorum* L. frente a *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. cereus*, *C. albicans*, y algunas especies de hongos y determinó que estos aceites tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de dichos microorganismos.

Aridogan (2002) determinó la composición química y actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales obtenidos de *Origanum onites*, *Mentha piperita*, *Juniperus exalsa*, *Chrysanthemum indicum*, *Lavandula hybrida*, *Rosa damascena*, *Echinophora tenuifolia* y *Foeniculum vulgare* contra microorganismos como *E. coli* (ATTC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *P. aeruginosa* (ATTC 27853). En este estudio se encontró que los aceites de orégano mostraron actividad antimicrobiana contra las tres bacterias, de la misma manera que *Chrysanthemum indicum* lo hizo contra *E. coli* y *S. aureus*.

Recientemente Burt y Reinders (2003) demostraron que los aceites esenciales de plantas como *Origanum vulgare* tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7.

Las plantas medicinales se utilizan como fármacos y como tales cuentan con efectos adversos si su administración no es controlada o se aplican en patologías para las que no están indicadas. Al igual que ocurre con los fármacos convencionales, los principios activos de las plantas medicinales se unen a diferentes estructuras del organismo pudiendo modificarlas. Si bien la concentración de estos principios suele ser baja en las plantas, también pueden producir cierta toxicidad o efectos no deseados. No obstante, la concentración limitada de principios activos hace que los efectos tóxicos sean menores y menos frecuentes que los de los fármacos de síntesis. Esto hace que el uso de extractos de plantas medicinales sea una buena alternativa en trastornos en los que los fármacos convencionales no son eficaces. Asimismo, puede complementar las terapias de enfermedades graves y sustituir a las empleadas en la prevención de afecciones, especialmente del aparato gastrointestinal, así como el respiratorio, digestivo, genitourinario y dermatológico (Ortega, 2002).

El escaso número de drogas efectivas e inocuas y la aparición de cepas microbianas multirresistentes a antibióticos sintéticos, ha motivado el estudio de las plantas medicinales como una alternativa terapéutica. Además también es importante para la economía de nuestro país, ya que México, país con alrededor de 3100 especies de plantas medicinales, en 1986 exportó 2544 toneladas de ellas, lo cual representó un valor de 3.3 millones de dólares (Ocampo, 2002). Desde el punto de vista científico, no

obstante la casi innegable veracidad de estas tradiciones, es imprescindible una verificación de estas propiedades curativas, poniéndolas a prueba frente a la acción de diversos agentes infecciosos.

En base a lo anterior, Lozoya (1989) realizó una evaluación de las propiedades antimicrobianas de extractos acuosos del tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora*), donde observó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de diversas bacterias gram positivas, gram negativas y levaduras.

También Rojas *et. al* (1992) evaluaron la actividad antimicrobiana de diversos extractos crudos de plantas medicinales mexicanas, encontrando actividad sobre de *E. coli* ATCC 8739.

Essawi y Srouf (1999) evaluaron la actividad antibacterial de plantas medicinales palestinas sobre diferentes especies de bacterias. Ellos encontraron que extractos de *Thymus organium*, *Thymus vulgaris* y *Majorana syriaca* mostraron efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922. También en el mismo año Marino M., *et. al.* (1999), demostraron la susceptibilidad de *E. coli* O157H:7 y *Yersinia enterocolitica* a los extractos de *Thymus vulgaris*.

7.3.3. Efecto de Extractos sobre la producción de toxinas por microorganismos

Las plantas nos resultan extremadamente útiles, por una parte nos aportan el oxígeno necesario para poder respirar, pero además aportan nutrientes para que podamos alimentarnos y algunos otros compuestos que nos ayudan a minimizar nuestras enfermedades. Desde hace unos años la investigación de plantas medicinales ya no es vista como un folclor, sino como una relevante actividad científica, ya que éstas son una alternativa viable en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas. Aunque se ha investigado el efecto que tienen las plantas medicinales sobre diversos microorganismos, han sido pocos los estudios realizados para observar el efecto que tienen sobre la producción de las toxinas que generan algunas bacterias, sin embargo a continuación se describen algunos de los trabajos publicados al respecto.

En el 2002, Hiroshi utilizó formulaciones de la medicina herbal usadas en China y Japón para tratar enfermedades diarreicas como el cólera; observando que *Rhei rizoma* inhibió la actividad de la toxina colérica, incluyendo la ADP-ribosilación y la elongación de células CHO.

García *et. al.* (2005) reportaron el efecto del extracto de *Haematoxylon brasiletto* sobre la producción de toxinas en *V. cholerae*, donde su producción se redujo de un 68% a 100%.

Recientemente Escobar *et. al.* (2005) realizaron un estudio sobre la actividad de extractos de plantas medicinales sobre el crecimiento, producción de verotoxinas y adhesión de *E. coli* O157:H7 a células HeLa, encontrando que los extractos etanólicos de *Haematoxylon brasiletto* ejercieron un efecto inhibitorio sobre estos eventos metabólicos.

7.3.4. Efecto de Mezclas de Extractos de Plantas sobre la inhibición del crecimiento de microorganismos

La medicina tradicional como parte importante de la cultura de los pueblos, ha sido durante siglos, el único sistema utilizado en la restauración de la salud de las generaciones pasadas, donde las plantas medicinales han cumplido un rol fundamental como medio para curar enfermedades en las personas, siendo las comunidades mas apartadas quienes han utilizado tradicionalmente estas plantas, para satisfacer sus necesidades básicas, acumulando prácticas ancestrales de selección, manejo y conservación de conocimientos que se han transmitido de una generación a otra.

En muchos casos la aplicación de un componente aislado no ha tenido el efecto deseado, bien porque no tiene el mismo poder curativo que cuando se toma en conjunto con el resto de componentes, o bien porque ha resultado tóxico. Los componentes de las plantas tienen un efecto sinérgico, interactuando todos a la vez, de manera que pueden complementar o potenciar a otros o neutralizar sus posibles efectos negativos. En este aspecto aunque es de gran importancia, no ha sido muy estudiado, sin embargo, a continuación describimos los estudios mas importantes al respecto.

En cuanto se refiere al efecto sinérgico de combinaciones de extractos de plantas así como de otros compuestos sobre el crecimiento de microorganismos, Sun y Oliver (1994) analizaron la actividad antimicrobiana de algunos compuestos generalmente reconocidos como seguros (GRAS) por mencionar diacetilo y ácido láctico, contra *V. vulnificus*, observando efectos letales en dicha bacteria.

Lachowicz (1998) estudió diferentes variedades de *Ocimum basilicum* contra patógenos de alimentos y reportó actividad antimicrobiana cuando se combinaba el aceite de anís a bajo pH y/o con cloruro de sodio, así como la combinación del linalol y el metilcarvicol.

De la misma manera Cuter en el 2000, determinó el efecto antimicrobiano de extractos de hierbas mezclados con citrato y/o de cloruro de sodio contra *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *Listeria monocytogenes* y *S. Typhimurium* inoculadas artificialmente en carne. Los resultados obtenidos concluyeron que las mezclas que contenían los conservadores exhibieron zonas de inhibición del crecimiento de las tres cepas bacterianas.

Ettayebi (2000) reportó que al combinar nisina con timol, se utilizó una menor dosis de éstos compuestos para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en comparación de la dosis utilizada por cada compuesto individualmente.

También Lambert (2001) encontró que mezclando el carvacrol y el timol a bajas concentraciones se producía una inhibición total del crecimiento en *P. aeruginosa* y *S. aureus*, debido al daño que se produjo en la integridad de la membrana.

Recientemente en el 2005 Nacer mencionó que las combinaciones de antimicrobianos de alimentos tales como compuestos aromáticos y ácidos parecen ser prometedoras para inhibir el crecimiento de *S. enteritidis* sv. Typhimurium.

Aunado a lo anterior, y dado el creciente desarrollo de la resistencia bacteriana contra muchos antibióticos o a los efectos secundarios de los mismos debido a las concentraciones elevadas en los que se utilizan en la actualidad, se hace imprescindible el estudio de alternativas y la evaluación de los efectos de extractos de plantas y sus combinaciones sobre el crecimiento por diferentes microorganismos, la cuales pueden representar opciones terapéuticas importantes y como conservadores de alimentos, de ahí el presente estudio.

MÉTODOS

8.1. Cepas utilizadas

Para este estudio utilizamos las cepas de *V. cholerae* O139 El Tor 1837 y *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870) (proporcionadas por la Dra. Elisa L. Elliot de la F.D.A., E.U.A). Estas cepas fueron conservadas a temperatura ambiente en agar Luria Bertani, LB, [Agar 15 g (BD BIOXON), Triptona de Caseína 10 g (BD BIOXON), Cloruro de Sodio 10 g (MERCK), Extracto de Levadura 5 g (BD BIOXON), aforado a 1 L]. Las cepas se resembraron en agar LB inclinado cada 2-3 meses para su uso.

8.1.1 Activación de cepas

Para la activación de *V. cholerae* tomamos una asada del cultivo de reserva mantenido a temperatura ambiente, y la inoculamos en tubos con 5 mL de caldo LB e incubamos a 37°C por 16-18 h.

8.2 Plantas medicinales

Después de una revisión bibliográfica sobre plantas que se utilizan actualmente en la medicina tradicional en México para aliviar enfermedades gastrointestinales, se seleccionaron 15. Estas fueron obtenidas en mercados del área metropolitana de Monterrey, N.L. e identificadas en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en la Tabla 1 se muestran las plantas estudiadas así como los lugares donde comúnmente se encuentran.

8.2.1 Obtención de los extractos de plantas

En aquellos casos en que la planta se obtuvo fresca, se cortó y secó a 50°C por 48 h. Ya estando secas éstas y las plantas colectadas secas, las trituramos en un molino Wiley (malla 10).

De estas muestras pesamos 20 g y les adicionamos 100 mL del solvente (metanol absoluto) y las mantuvimos en reflujo (Soxhlet) durante 24 h aproximadamente a 65°C. Al término del reflujo, el extracto fue concentrado en un rotavapor R-3000 Buchi a una temperatura de 65°C y 30% de rotación. Posteriormente se colocaron en platos extendidos hasta la volatilización completa del solvente. Los extractos secos los resuspendimos con una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.1. Los extractos se esterilizaron por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.45µ de

poro y los almacenamos a 4°C utilizándolos en no más de siete días. Para determinar el peso seco del extracto tomamos alícuotas (1 mL) y los colocamos en viales previamente tarados, éstos los introducimos en una estufa y se llevaron a sequedad constante y por diferencia de peso obtuvimos el peso seco (Alarcón, 2002).

Tabla 1.

Plantas utilizadas en el presente estudio.

Nombre común	Nombre científico	Familia	Parte estudiada	Distribución
Palo de brasil	<i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst.	<i>Leguminosae</i>	Tallo	Chihuahua, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca.
Palo de campeche	<i>Haematoxylon campechanum</i> L.	<i>Fabaceae</i>	Tallo	Campeche, Centro América
Mezquite	<i>Prosopis glandulosa</i> Torr.	<i>Leguminosae</i>	Tallo	México
Ébano	<i>Pithecellobium fleuxicaule</i> (Berl.)	<i>Leguminosae</i>	Hoja y Tallo	México
Huizache	<i>Acacia farneciana</i> (L.) Willd.	<i>Leguminosae</i>	Tallo	Tamaulipas, Nuevo León, Chihuahua, Durango, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Oaxaca.
Tepescohuite	<i>Mimosa tenuiflora</i> (Bent.)	<i>Leguminosae</i>	Tallo	América, México
Estafiate	<i>Artemisa mexicana</i>	<i>Compositae</i>	Hoja-tallo	México.
Artemisa	<i>Artemisa</i> sp.	<i>Compositae</i>	Hoja-tallo-flor	México.
Zacate limón	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Poaceae</i>	Hoja-tallo	México.
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Mirtaceae</i>	Corteza	México.
Pirul	<i>Shinus terebentifolia</i>	<i>Anacardiaceae</i>	Hoja	México.
Damiana	<i>Turnera diffusa</i>	<i>Turneraceae</i>	Hoja	México.
Sangre Drago	<i>Jatropha dioca</i>	<i>Eupharbiaeae</i>	Tallo	México, Centro y Sudamérica.
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> L.	<i>Labiatae</i>	Hoja	México.
Mejorana	<i>Majorana hortensis</i>	<i>Labiatae</i>	Hoja-tallo	México.

8.3. Ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos

8.3.5. Ensayos preliminares

Una vez activadas las cepas bacterianas de *V. cholerae* tomamos una alícuota (100 μ L) y la inoculamos por extensión en placas con agar LB. Posteriormente realizamos pozos al agar en los que añadimos 100 μ L de los diferentes extractos estériles y finalmente incubamos las placas a 37°C por 24 h. El efecto inhibitorio lo determinamos midiendo el diámetro de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del pozo.

8.3.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (C.M.B.) de los extractos

A los extractos que mostraron actividad inhibitoria les determinamos la C.M.B., esta la definimos como la concentración mínima del extracto capaz de eliminar completamente el crecimiento del microorganismo. Utilizamos la técnica de inhibición en caldo de cultivo (Alarcón, 2002). Para esto, añadimos a tubos con 3 mL de caldo LB, diferentes concentraciones del extracto. Posteriormente inoculamos al 1% (v/v) la cepa activada. Después de incubar por 24 h a 37°C analizamos la presencia o ausencia de crecimiento tomando una alícuota de 100 μ L del cultivo que inoculamos en una placa petri y posteriormente agregamos agar LB e incubamos por 24 h a 37°C, al término de la incubación observamos la concentración que no permitió el desarrollo de crecimiento y determinamos la C.M.B. Cada prueba fue realizada por duplicado y con tres repeticiones. Como control negativo utilizamos inóculo de la cepa sin extracto y como control positivo usamos Tetraciclina tal y como se especificó arriba.

8.3.3 Determinación del efecto en el crecimiento por Concentraciones Subletales

Estos ensayos se realizaron utilizando extractos de las plantas *Haematoxylon brasiletto* (Palo de brasil), *Acacia farneciana* (Huizache), *Prosopis glandulosa* (Mezquite) y *Pithecellobium flexicaule* (Ébano) que fueron las plantas que mostraron la mejor actividad antimicrobiana.

Para esto en 3 mL de caldo LB adicionamos el 0, 25, 50, 75 y 100% de la C.M.B. de los extractos analizados e inoculamos a 1% v/v con la cepa, posteriormente llevamos a incubación a 37°C por 24 h. Realizamos cuentas microbianas de los cultivos mediante la técnica de difusión en agar. Para esto, tomamos alícuotas y realizamos diluciones decimales y sembramos en cajas petri para posteriormente agregarles agar LB. Después de que las placas gelificaron las incubamos a 37°C por 24 h.

8.3.5. Determinación del efecto inhibitorio del crecimiento de *V. cholerae* por las mezclas de extractos

Utilizamos como base el extracto de *Haematoxylon brasiletto*, ya que fue el que mostró la mejor C.M.B. y lo mezclamos con los extractos restantes como esta especificado en la Tabla 2.

El 25% de la C.M.B. del *Haematoxylon brasiletto* (Palo de brasil) fue mezclado con el 25, 50 y 75% de *Acacia farneciana* (Huizache), por otro lado el 25% de la C.M.B. del *Haematoxylon brasiletto* (Palo de brasil) se mezcló con el 25, 50 y 75% de *Prosopis glandulosa* (Mezquite), también el 25% de la C.M.B. del *Haematoxylon brasiletto* (Palo de brasil) lo mezclamos con el 25, 50 y 75% del *Pithecellobium flexicaule* (Ébano), ver la Tabla 2. Estas mezclas fueron agregadas a tubos de ensayo inoculados con el 1% (v/v) del cultivo activado y aforados con medio LB a un volumen final de 3 mL. Posteriormente fueron incubaron a 37°C por 24 h. Analizamos el efecto del crecimiento de las cepas tomando alícuotas de 200 µL y realizando diluciones decimales; de estas sembramos 100 µL en cajas petri, posteriormente agregamos agar LB e incubamos por 24 h a 37°C, realizamos la cuenta de UFC/mL y analizamos e interpretamos los resultados. Cada prueba fue realizada por duplicado y con tres repeticiones.

8.3.5. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (C.M.B.) de las mezclas de extractos de plantas

Se realizaron las mezclas de los extractos como mencionamos anteriormente (Tabla 2). Estas mezclas fueron agregadas a tubos de ensayo inoculados con el 1% (v/v) del cultivo activado y aforadas con caldo LB a un volumen final de 3 mL, posteriormente se incubaron a 37°C por 24 h. Determinamos la presencia o ausencia de crecimiento sembrando 100 µL del tratamiento sobre una placa petri, posteriormente agregamos agar LB e incubamos por 24 h a 37°C, al término de la incubación observamos la concentración que no permitió el desarrollo de crecimiento y determinamos la C.M.B. Cada prueba la realizamos por duplicado y con tres repeticiones.

Tabla 2.

Combinaciones utilizadas para evaluar el efecto de mezclas de extractos sobre el crecimiento de *V. cholerae*.

# Mezcla	Cepa	Concentración de <i>Haematoxylon brasiletto</i> (% de C.M.B.)	Concentración de <i>Acacia farneciana</i> (% de C.M.B.)	Concentración de <i>Prosopis glandulosa</i> (% de C.M.B.)	Concentración de <i>Pithecellobium flexicaule</i> (% de C.M.B.)
1	<i>Vibrio cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870)	0.15 mg/mL (25%)	1.83 mg/mL (25%)	-----	-----
2		0.15 mg/mL (25%)	3.63 mg/mL (50%)	-----	-----
3		0.15 mg/mL (25%)	5.47 mg/mL (75%)	-----	-----
4		0.15 mg/mL (25%)	-----	1.85 mg/mL (25%)	-----
5		0.15 mg/mL (25%)	-----	3.7 mg/mL (50%)	-----
6		0.15 mg/mL (25%)	-----	5.55 mg/mL (75%)	-----
7		0.15 mg/mL (25%)	-----	-----	3.85 mg/mL (25%)
8		0.15 mg/mL (25%)	-----	-----	7.7 mg/mL (50%)
9		0.15 mg/mL (25%)	-----	-----	11.5 mg/mL (75%)
10	<i>Vibrio cholerae</i> O139 El Tor 1837	0.15 mg/mL (25%)	1.3 mg/mL (25%)	-----	-----
11		0.15 mg/mL (25%)	2.6 mg/mL (50%)	-----	-----
12		0.15 mg/mL (25%)	3.9 mg/mL (75%)	-----	-----
13		0.15 mg/mL (25%)	-----	2.5 mg/mL (25%)	-----
14		0.15 mg/mL (25%)	-----	5.0 mg/mL (50%)	-----
15		0.15 mg/mL (25%)	-----	7.5 mg/mL (75%)	-----
16		0.15 mg/mL (25%)	-----	-----	3.9 mg/mL (25%)
17		0.15 mg/mL (25%)	-----	-----	7.8 mg/mL (50%)
18		0.15 mg/mL (25%)	-----	-----	11.7 mg/mL (75%)
----- No se agregó extracto					

8.4 Semipurificación de compuestos por Cromatografía Líquida al Vacío (VLC)

Los extractos que semipurificamos fueron *H. brasiletto*, *P. fleuxicaule*, y *P. juliflora* además de las mezclas de los tratamientos 5, 6, 8, 9, 14, 15, 17 y 18 (Tabla 2), mediante la técnica de cromatografía líquida al vacío (Sarker, 2005) para la cual impregnamos 30g de Sílica gel 60 (MERCK) con 20 mL del extracto o de las mezclas de extractos y fue secada hasta eliminar el solvente completamente y triturada en un mortero hasta obtener un polvo fino.

En un embudo Büchner colocamos un círculo de papel filtro de 13 cm de diámetro y se empacó con Sílica gel 60 (MERCK) aproximadamente 5 cm de altura, golpeamos suavemente para uniformar la sílica, agregamos Hexano (J.T. BAKER) cuidadosamente por la pared del embudo hasta que rebasó el nivel de la sílica, aproximadamente 300 mL. Mediante la aplicación de vacío compactamos la sílica. Agregamos los 30g de la sílica impregnada con el extracto o mezcla. En la parte superior del embudo y todo el embudo empacado colocamos un poco de algodón y un círculo de papel filtro de 13 cm de diámetro.

Utilizamos diferentes sistemas de elusión empezando por Hexano y Cloroformo, seguido de las siguientes mezclas de Cloroformo:Metanol (v/v): 9.5:0.5, 9:1, 8.5-1.5, 8:2, 7.5:2.5, 7:3 y 1:1. Todas las fracciones fueron concentradas y colectadas en viales ambar. A dichas fracciones les determinamos la actividad antimicrobiana en pozo contra las cepas de estudio y también les realizamos cromatografía en placa fina (TLC)

reveladas con cloruro de cobalto para observar las bandas separadas. A las fracciones que mostraron actividad antimicrobiana les determinamos los grupos químicos.

8.5 Ensayos químicos preliminares para extractos de plantas

A los extractos y a las mezclas de extractos les realizamos la determinación de los principales grupos químicos que presentan:

8.5.1 Hidrocarburos insaturados

Para determinar insaturaciones utilizamos la prueba de Bayer en donde se colocaron 2 gotas del extracto disueltas en 1-2 mL de acetona concentrado (CTR SCIENTIFIC). Posteriormente añadimos gota a gota una solución acuosa de permanganato de potasio (FERMONT) al 1%. La aparición de un precipitado café indico la presencia de hidrocarburos insaturados (Domínguez A, 1988).

8.5.2. Esteroles y saponinas

Utilizamos la prueba de Liebermann-Burchard, en la cual mezclamos 1 mL de anhídrido acético (CTR SCIENTIFIC) y 1 mL de cloroformo (DEQ), se enfriaron a 0°C y se les añadió una gota de ácido sulfúrico (EM SCIENCE). Una alícuota de este

reactivo fue puesto en contacto con la muestra disuelta en 1 mL de cloroformo (DEQ). La prueba se consideró positiva con la formación de colores azul, verde, rojo, naranja, morado o rojo (Domínguez A, 1988).

8.5.3. Flavonoides

Para esto utilizamos la Prueba de Shinoda donde el extracto fue mezclado con una limadura de magnesio (CTR SCIENTIFIC) y unas pocas gotas de ácido clorhídrico concentrado (CTR SCIENTIFIC). Consideramos la prueba positiva al presentarse coloraciones: naranja (flavonas), roja (flavononas), roja azulosa (flavonoles), violeta (xantanas o flavonoles) (Domínguez A, 1988).

8.5.4. Sesquiterpenlactonas

Se usó la prueba de Legal. Para ello, depositamos 2 gotas del extracto, las mezclamos con 3 gotas de piridina (BAKER) y una gota de nitroprusiato de sodio (CTR SCIENTIFIC) al 0.5%. Después añadimos gota a gota, 4 gotas de hidróxido de potasio 2N (CTR SCIENTIFIC). Una coloración rosa fue indicio de lactonas α y β insaturadas (Domínguez A, 1988).

8.5.5. Carbohidratos

Los determinamos mediante la prueba de la Antrona. Para lo cual, mezclamos una gota de la muestra disuelta en agua con 1 gota de antrona (FERMONT) al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado (EM SCIENCE). La prueba fue positiva al formarse un anillo azul-verdoso en la interfase (Domínguez A, 1988).

8.5.6. p-benzoquinonas

En esta prueba mezclamos una gota de la muestra, con una gota de solución etanólica al 0.2% de p-nitrofenilacetoniitrilo (ALFA AESAR) y 1 gota de hidróxido de sodio (CTR SCIENTIFIC). La prueba fue positiva al observarse una coloración azul o violeta (Domínguez A, 1988).

8.5.7. Alcaloides

Para esto utilizamos la prueba de Dragendorff y realizamos dos soluciones. La solución A fue preparada mezclando 8 gr de nitrato de bismuto (FERMONT) con 20 mL de ácido nítrico (CTR SCIENTIFIC) al 30% y la solución B mezclando 27.2 gr de yoduro de potasio (TECNICA QUIMICA) en 50 mL de agua. Se mezclaron las soluciones A y B y las dejamos reposar 24 hr. Esta mezcla fue filtrada y aforada a 100

mL con agua destilada. Agregaron unas cuantas gotas de este reactivo a la muestra. La prueba fue positiva con la presencia de un precipitado de color naranja-marrón (Domínguez A, 1988).

8.5.8. Coumarinas

Se empleó la prueba de Emerson, en la cual mezclamos 0.5% de carbonato de calcio (MERCK), 0.9% de 4-aminoantipirina (SPECTRUM), 5.4% de ferrocianuro de potasio (CTR SCIENTIFIC) en agua destilada, una gota de esta mezcla se agregó a una gota de la muestra. La prueba fue positiva al observarse una coloración amarilla (Domínguez A, 1988). Por otro lado también se mezcló la muestra con una gota de hidróxido de sodio (CTR SCIENTIFIC) al 10%; una coloración amarilla indicó la presencia de coumarinas (Domínguez A, 1988).

8.5.9. Alcoholes

Para ello mezclamos unas gotas del extracto con 8 gotas de disulfuro de carbono (CTR SCIENTIFIC) y 100 mg de hidróxido de potasio (CTR SCIENTIFIC) triturado. Se agitó durante 5 minutos, y la presencia de una coloración o un precipitado amarillo fue indicio de compuestos alcohólicos (Domínguez A, 1988).

8.5.10. Aldehídos y cetonas

A una gota del extracto le agregamos 2 gotas de etanol (DEQ) y 1 gota de 2,4-dinitrofenilhidracina (SPECTRUM), para la cual disolvimos en caliente 5 gr de 2,4-dinitrofenilhidracina en 60 mL de ácido fosfórico al 85% (CTR SCIENTIFIC), diluida con 39.5 mL de etanol y después se filtró. La presencia de un precipitado rojo fue positiva para carbonilos aromáticos, un precipitado anaranjado indicó carbonilos α o β insaturados y/o un precipitado amarillo fue positivo para carbonilos saturados (Domínguez A, 1988).

8.5.11. Ésteres

Para esto, a una gota de extracto le agregamos una solución alcalina de hidroxilamina (SPECTRUM), fue enfriada en baño de hielo y acidulada con ácido clorhídrico concentrado (CTR SCIENTIFIC), después agregamos unas cuantas gotas de cloruro férrico (CTR SCIENTIFIC). La coloración púrpura indicó la presencia de ésteres (Domínguez A, 1988).

8.5.12. Hidrocarburos aromáticos, éteres aromáticos y fenoles.

Mezclamos 1 gota del extracto con 1 gota de una mezcla de 1 mL formaldehído (CTR SCIENTIFIC) y ácido sulfúrico concentrado (EM SCIENCE). Se presentó en la superficie una coloración rosa, naranja o rojo indicando la presencia de derivados de benceno, y para naftaleno la coloración fue azul-verdoso o verde (Domínguez A, 1988).

8.5.13. Cloruros

Colocamos 1 gota de extracto disuelta en agua bi-destilada (3 mL) y agregamos 2 ó 3 gotas de una solución de nitrato de plata, la cual fue preparada disolviendo 10 mg de nitrato de plata (CTR SCIENTIFIC) con 20 mL de agua destilada. Un precipitado blanco indicó la presencia de cloruros (Domínguez A, 1988).

8.5.14. Taninos

En la determinación de taninos, la muestra fue disuelta la muestra en 1 mL de agua y 1 mL de etanol (DEQ). Añadimos unas gotas de cloruro férrico (CTR SCIENTIFIC) al 5% en etanol (p/v); una coloración verde oscuro o negra fue indicativo de hidroxilos fenólicos.

8.6 Diseño estadístico

Los resultados fueron analizados mediante un Análisis de Varianza además de la prueba de comparación múltiple de medias (Bonferroni), a través del paquete estadístico SigmaStat versión 1.0.

DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS

Diagrama de Flujo

Obtención de extractos

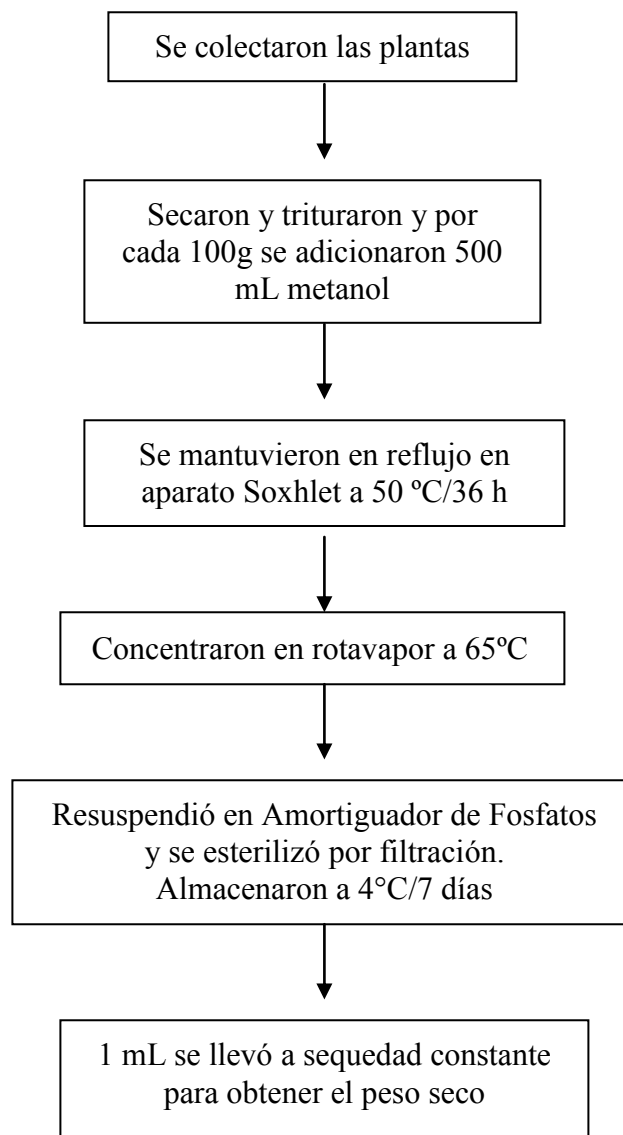


Diagrama de Flujo

Ensayos preliminares de actividad antimicrobiana de los extractos

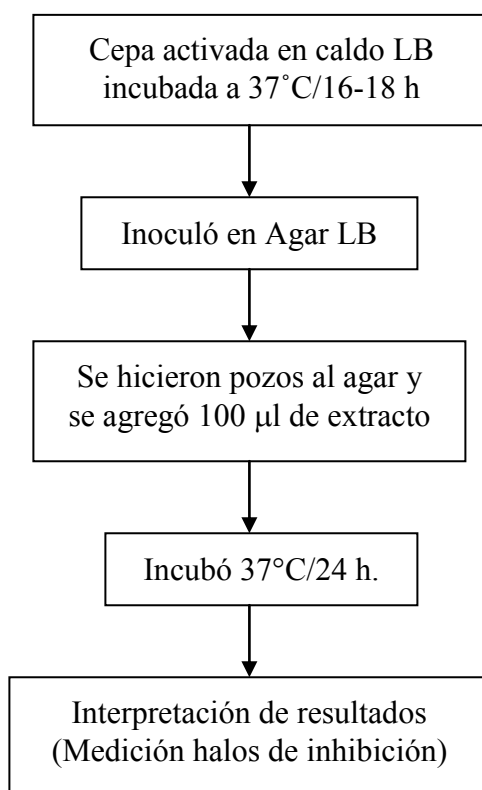


Diagrama de Flujo

Determinación de la C.M.B.

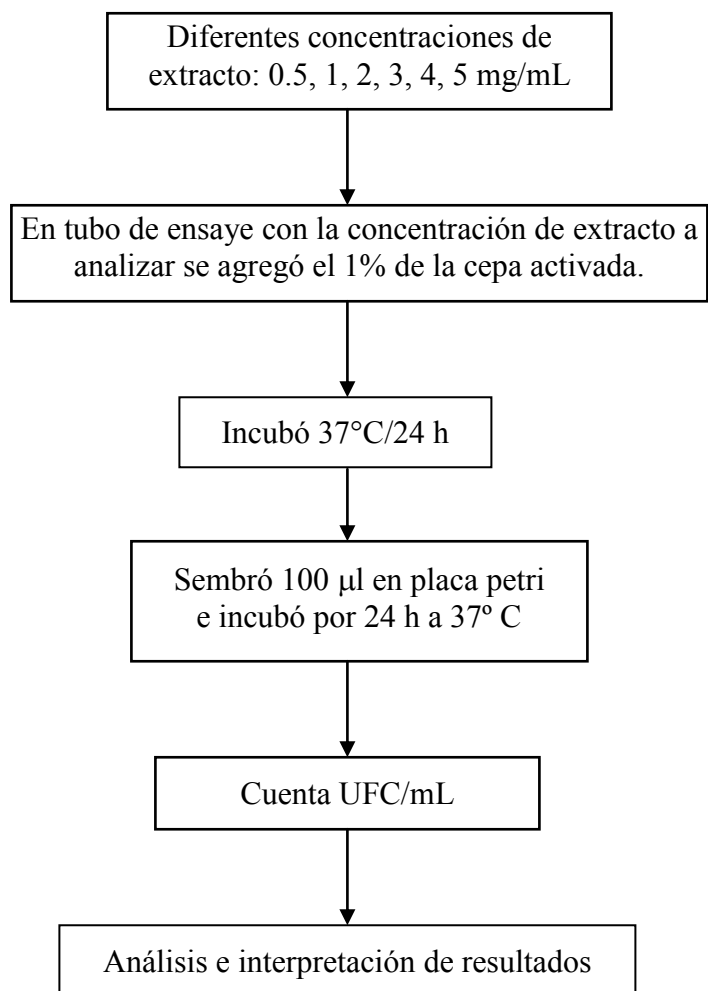


Diagrama de Flujo

Determinación de efecto inhibitorio de concentraciones subletales

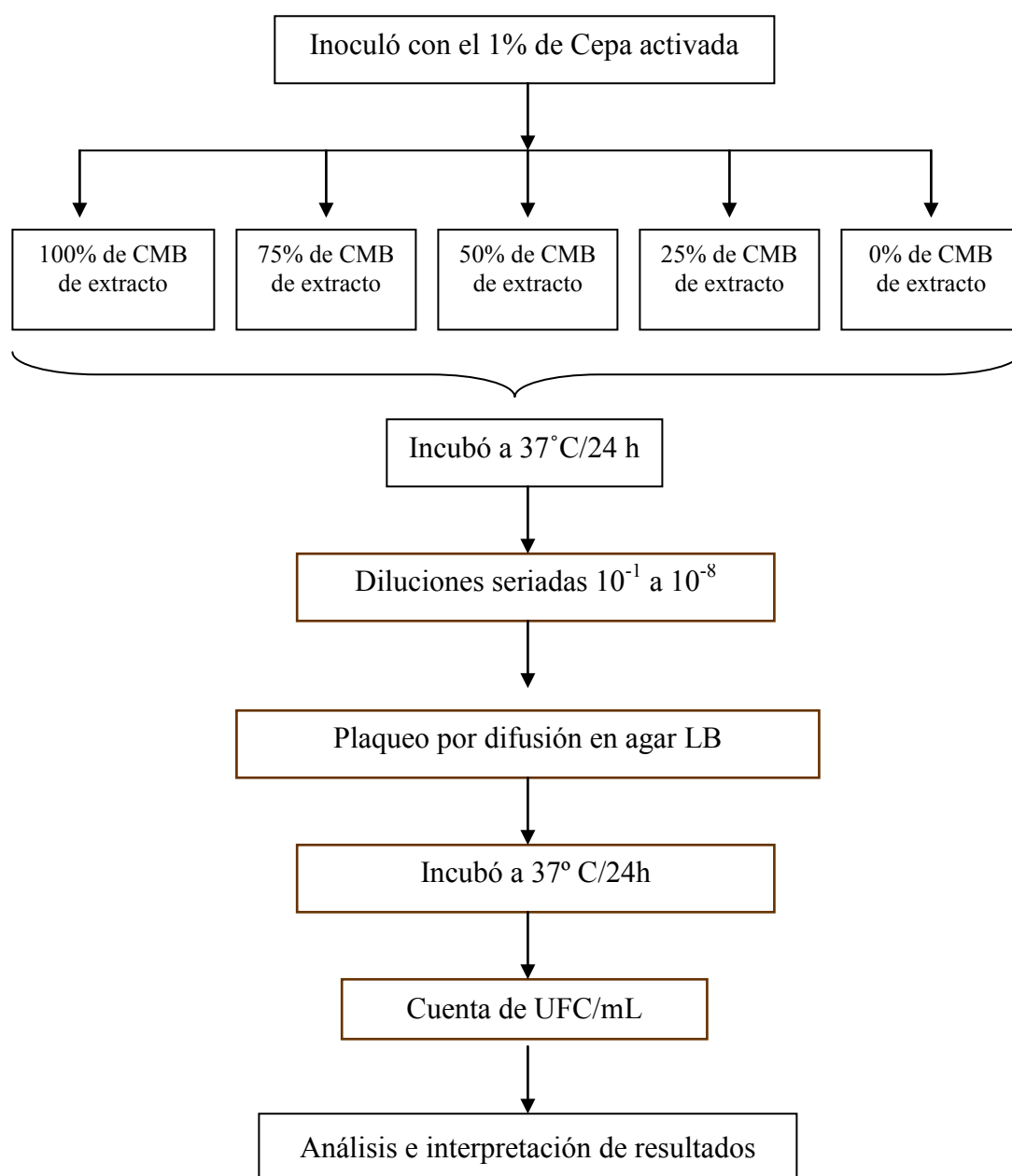


Diagrama de Flujo

Diseño de Mezclas

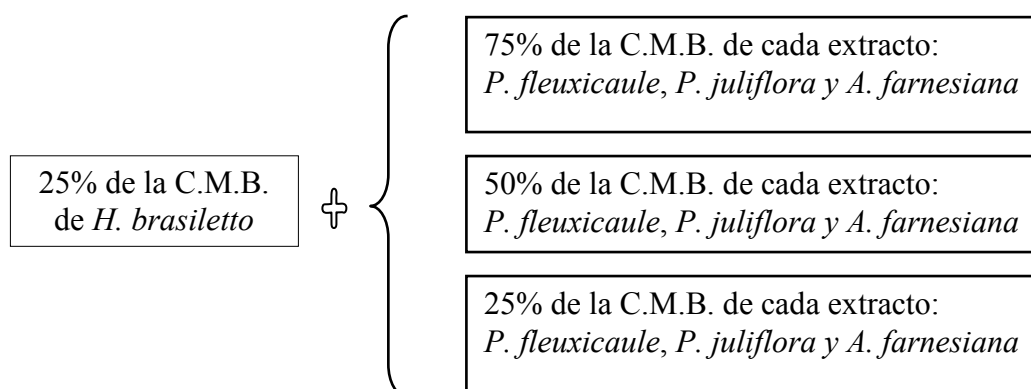


Diagrama de Flujo

Determinación del efecto en el crecimiento de concentraciones subletales.

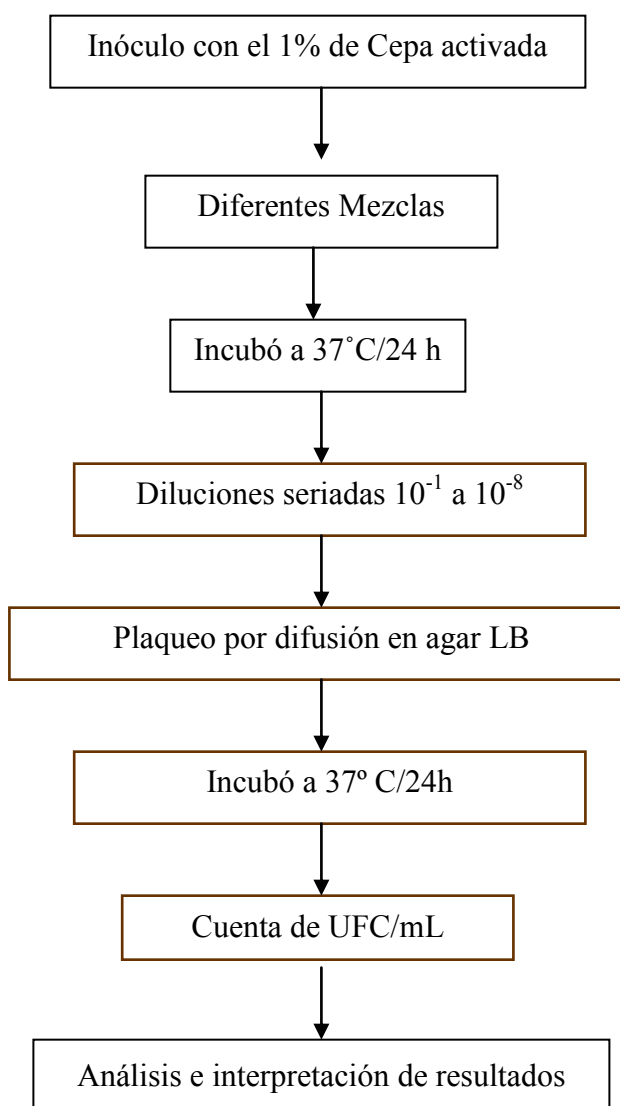
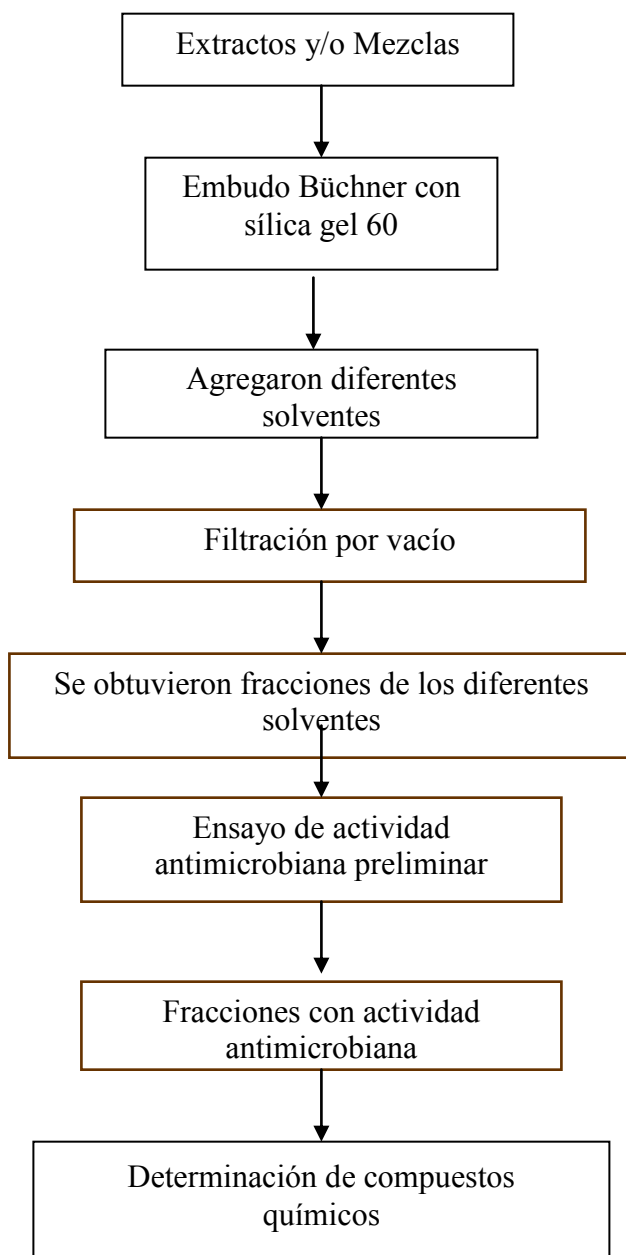


Diagrama de Flujo

Semipurificación de compuestos y caracterización



RESULTADOS

9.1 Ensayos preliminares

En el presente trabajo se analizaron los extractos metanólicos de 15 plantas utilizadas en la medicina tradicional (Tabla 3). Los quince extractos mostraron actividad antimicrobiana contra las dos cepas de *V. cholerae*. Sin embargo, los extractos que mostraron la mayor actividad antimicrobiana fueron *H. brasiletto*, *P. fleuxicaule*, *A. farnesiana*, *P. glandulosa*, *H. campechanum* y *M. tenuiflora* (Figura 2 y 3). Dados estos resultados optamos por trabajar con los extractos de *H. brasiletto*, *P. fleuxicaule*, *A. farnesiana* y *P. glandulosa* ya que fueron plantas de mayor prevalencia en nuestro territorio y las que mostraron mayores halos de inhibición.

Tabla 3.

Determinación del efecto inhibitorio de las plantas utilizadas y sus partes sobre el crecimiento de *Vibrio cholerae*.

Nombre común	Nombre científico	Parte utilizada	Halo de inhibición (mm)
Palo de brasil	<i>Haematoxylon brasiletto</i>	Tallo-corteza	24±0.5*
Ébano	<i>Pithecellobium fleuxicaule</i>	Tallo-corteza	24±0.5*
Huizache	<i>Acacia farnesiana</i>	Tallo-corteza	24±2*
Mezquite	<i>Prosopis glandulosa</i>	Tallo-corteza	24±1*
Palo de campeche	<i>Haematoxylon campechanum</i>	Tallo-corteza	24±1*
Tepezcohuite	<i>Mimosa tenuiflora</i>	Tallo-corteza	24±3*
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Hoja	21±2*
Mejorana	<i>Majorana hortensis</i>	Hoja-tallo	21±2*
Estafiate	<i>Artemisa mexicana</i>	Hoja-tallo	12±3*
Artemisa	<i>Artemisa sp.</i>	Hoja-tallo-flor	12±2*
Zacate limón	<i>Cymbopogon citratus</i>	Hoja-tallo	12±1*
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	Corteza	12±3*
Pirul	<i>Shinus terebentifolia</i>	Hoja	12±2*
Damiana	<i>Turnera diffusa</i>	Hoja	12±2*
Sangre Drago	<i>Jatrofa dioica</i>	Tallo	12±3*
* Desviación estándar.			



Figura 3. Resultados del ensayo preliminar con el método de difusión del extracto en pozo en agar con la cepa *V. cholerae* O1 Inaba clásica (ATCC 25870).

1: *M. hortensis*, 2: *P. fleuxicaule* (hojas), 3: *S. terebentifolia*, 4: *P. glandulosa* (tallo), 5: *P. fleuxicaule* (tallo), 6: *A. farnesiana*, 7: Amortiguador de fosfatos (control negativo).

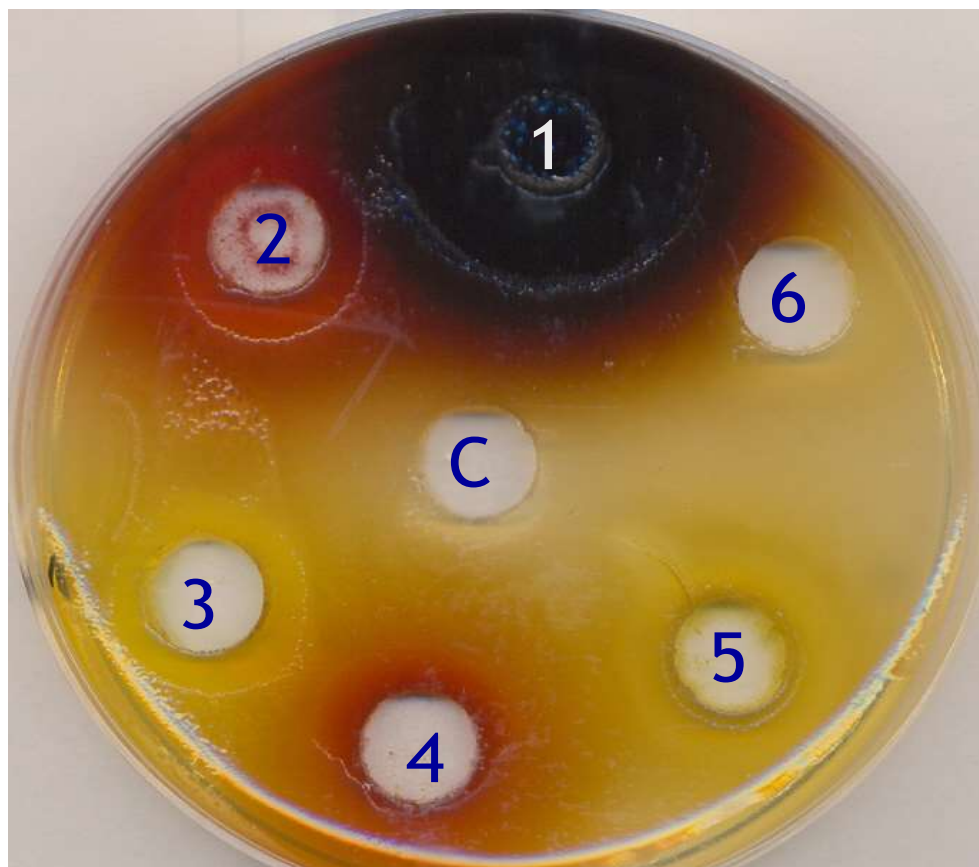


Figura 4. Resultados del ensayo preliminar con el método de difusión del extracto en pozo en agar con la cepa *V. cholerae* O1 Inaba clásica (ATCC 25870).

1: *H. brasiletto*, 2: *H. campechanum*, 3: *P. fleuxicaule* (hojas), 4: *P. fleuxicaule* (tallo), 5: *A. farnesiana* (tallo), 6: *P. glandulosa*, C: Amortiguador de fosfatos (control negativo).

9.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (C.M.B.) de los extractos

Determinamos la C.M.B. a los cuatro extractos metanólicos que mostraron la mayor actividad antimicrobiana y obtuvimos que para las dos cepas la C.M.B. de *H. brasiletto* fue 0.6 mg/mL, y con *P. fleuxicaule* fue de 15 mg/mL. Con el extracto de *A. farnesiana* la C.M.B. fue de 7.3 y 5.2 mg/mL y con el extracto de *P. glandulosa* fue de 7.4 y 10mg/mL para *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870) y *V. cholerae* O139 el Tor 1837 respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4.

Concentración Mínima Bactericida de extractos contra el crecimiento de *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870) y *V. cholerae* O139 el Tor 1837.

Extracto	C.M.B. en <i>V. cholerae</i> O1 Inaba	C.M.B. en <i>V. cholerae</i> O139
	Clásica (ATCC 25870) (mg/mL)	El Tor 1837 (mg/mL)
<i>H. brasiletto</i> (Palo de brasil)	0.6±0.25*	0.6±0.2*
<i>A. farnesiana</i> (Huizache)	7.3±2.8*	5.2±0.4*
<i>P. glandulosa</i> (Mezquite)	7.4±1.51*	10±0.89*
<i>P. fleuxicaule</i> (Ébano)	15.4±0.89*	15.6±0.89*
Control +: Tetraciclina	2 µg/mL	2 µg/mL
* Desviación estándar		

9.3 Determinación del efecto en el crecimiento por Concentraciones Subletales

Una vez obtenida la Concentración Mínima Bactericida se procedió a determinar el efecto subletal de los extractos en el crecimiento de las cepas de *V. cholerae*. Se encontró que el extracto de *H. brasiletto* (Palo de brasil) no mostró efecto subletal del crecimiento cuando se utilizaron concentraciones subletales $p < 0.05$ (Figura 5).

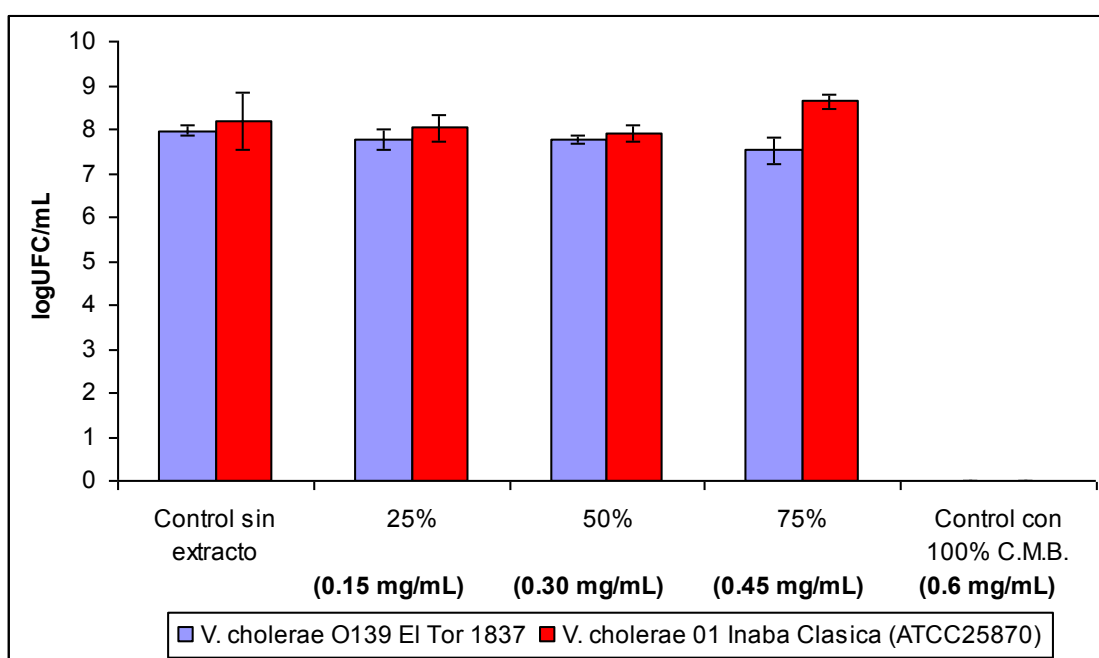


Figura 5. Efecto de concentraciones subletales (25%, 50% y 75%) de la C.M.B. del extracto de *H. brasiletto* (Palo de brasil) contra el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837 y *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).

Al analizar el extracto de *P. fleuxicaule* (Ébano) contra el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837 no se observó efecto subletal al exponerlos con el 25% y 50% de la C.M.B.; sin embargo si se observó diferencia significativa ($p<0.05$) al exponer el cultivo con el 75% de la C.M.B. Por otro lado se encontró diferencia significativa ($p<0.05$) al exponer a *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870) con las concentraciones subletales (25%, 50% y 75%) de la C.M.B. mostrada por el Ébano (Figura 6).

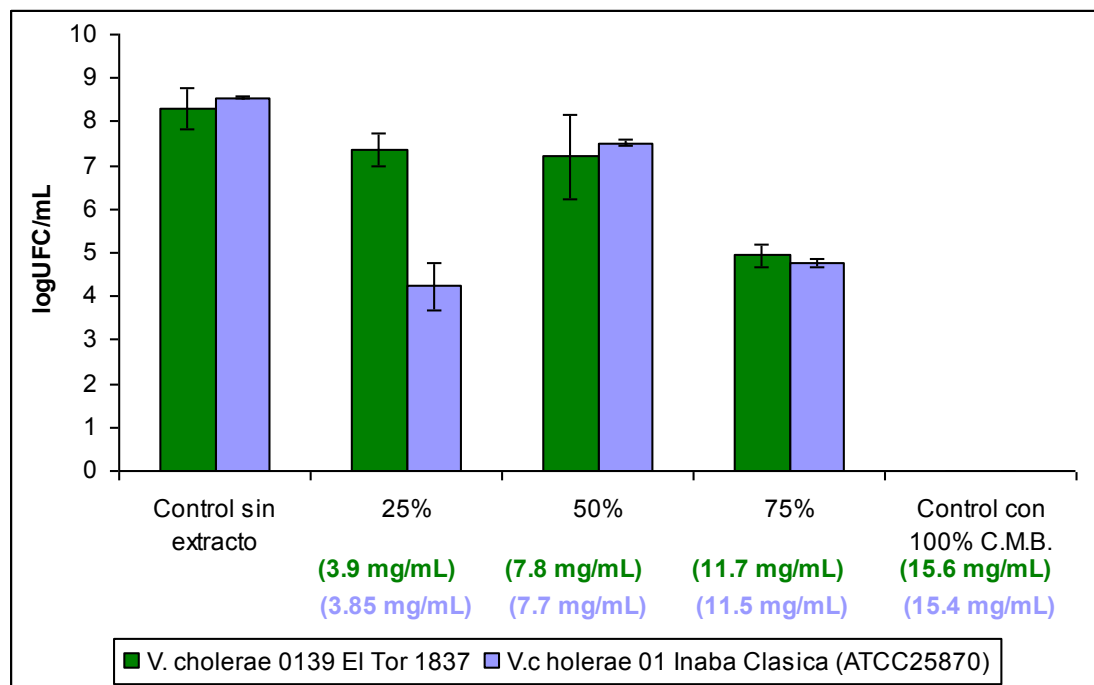


Figura 6. Efecto de concentraciones subletales (25%, 50% y 75%) de la C.M.B. del extracto de *P. fleuxicaule* (Ébano) contra el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837 y *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).

Concentraciones menores a la C.M.B. (25%, 50% y 75%) del extracto de *A. farnesiana* (Huizache) no mostraron efecto subletal contra el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837, sin embargo se encontró diferencia significativa ($p<0.05$) al exponer a *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870) con las concentraciones subletales (25% y 50%) de la C.M.B mostrada por *A. farnesiana* (Figura 7).

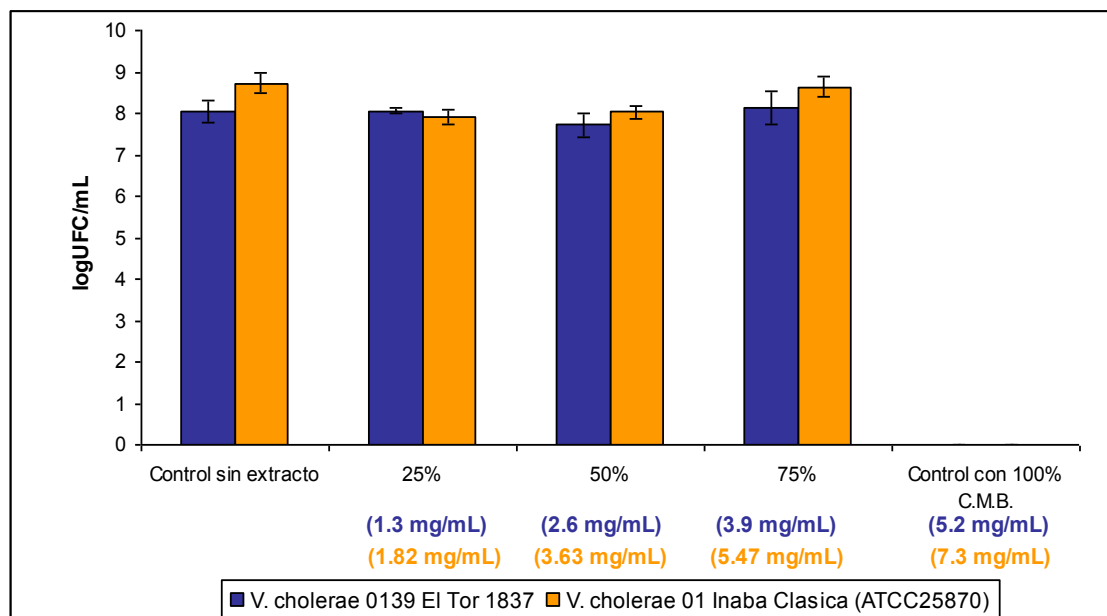


Figura 7. Efecto de concentraciones subletales (25%,50% y 75%) de la C.M.B. del extracto de *A. farnesiana* (Huizache) contra el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837 y *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).

Se encontró que concentraciones menores a la C.M.B. de *P. glandulosa* (Mezquite) no tuvieron un efecto subletal sobre las cepas probadas (Figura 8).

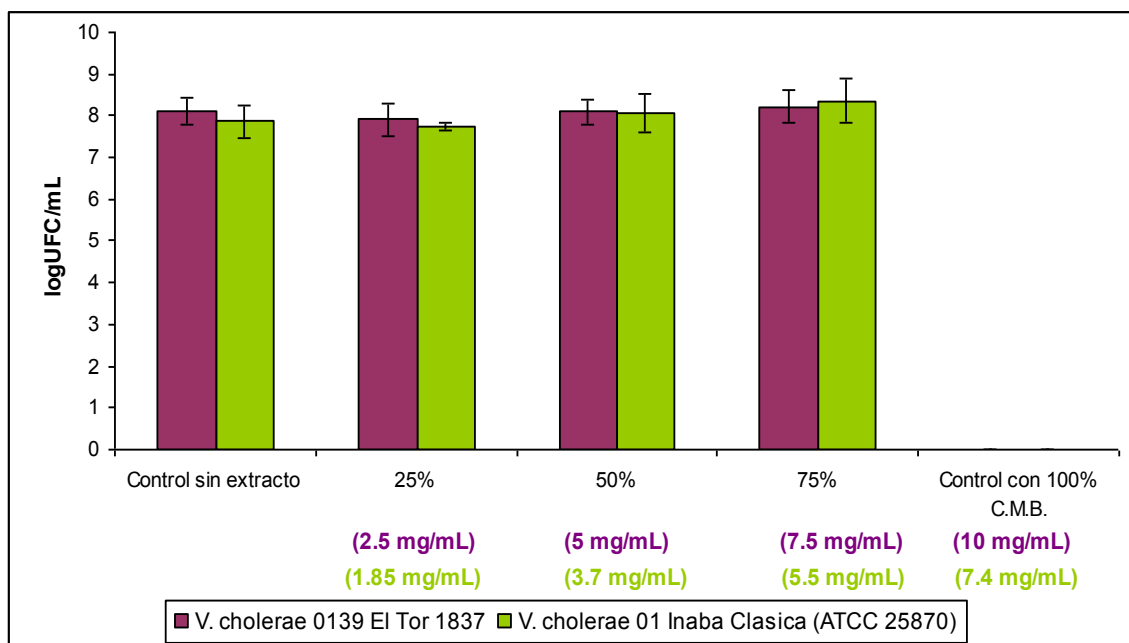


Figura 8. Efecto de concentraciones subletales (25%,50% y 75%) de la C.M.B. del extracto de *P. glandulosa* (Mezquite) contra el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837 y *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).

9.4 Determinación del efecto inhibitorio del crecimiento de *V. cholerae* por las mezclas de extractos

Se observó que las mezclas 1, 2 y 3 (ver Tabla 2) no tuvieron efecto inhibitorio en el crecimiento de *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870) Figura 9.

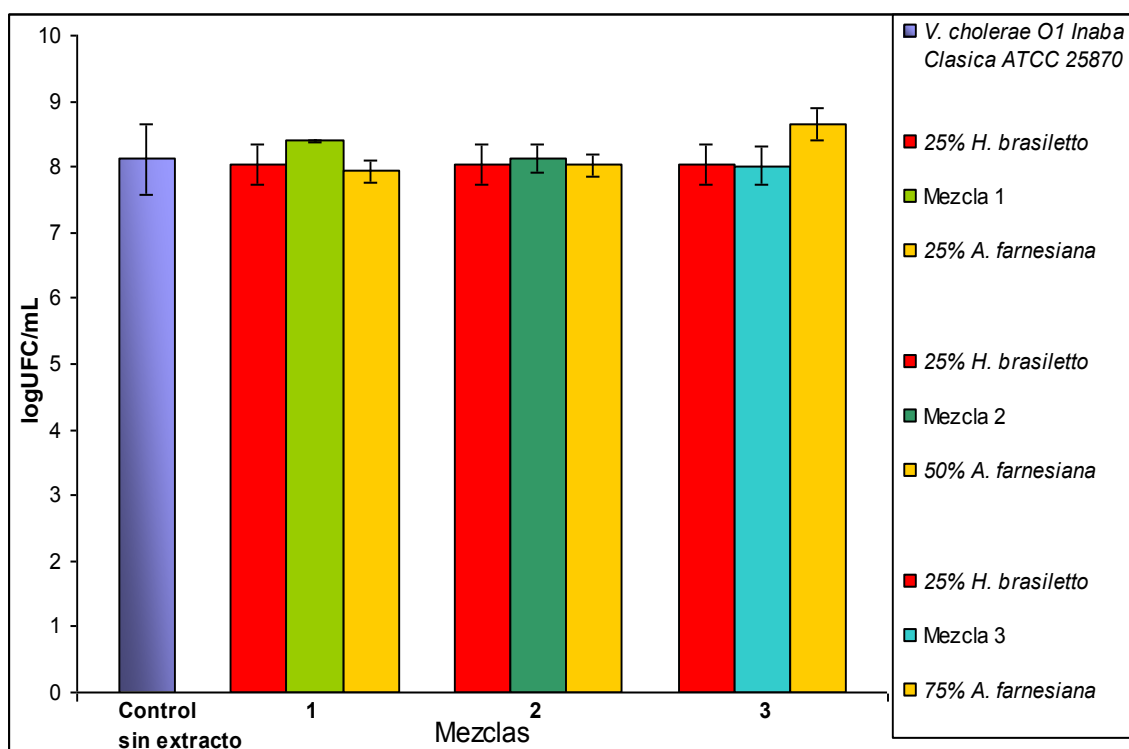


Figura 9. Determinación del efecto de mezclas de extractos *H. brasiletto*-*A. farnesiana* sobre el crecimiento de *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870). En estas mezclas la concentración de *H. brasiletto* 25% de la C.M.B. [0.15 mg/mL] se mantuvo constante, y la variación fue en la concentración de *A. farnesiana* usada.

Al exponer el cultivo microbiano de *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870) contra las mezclas 4, 5 y 6, solo se observó una diferencia significativa en la reducción del crecimiento por la mezcla 6 (Figura 10). El efecto de ésta mezcla también es estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al observado al agregar las concentraciones subletales del *H. brasiletto* (25%) y *P. glandulosa* (75%).

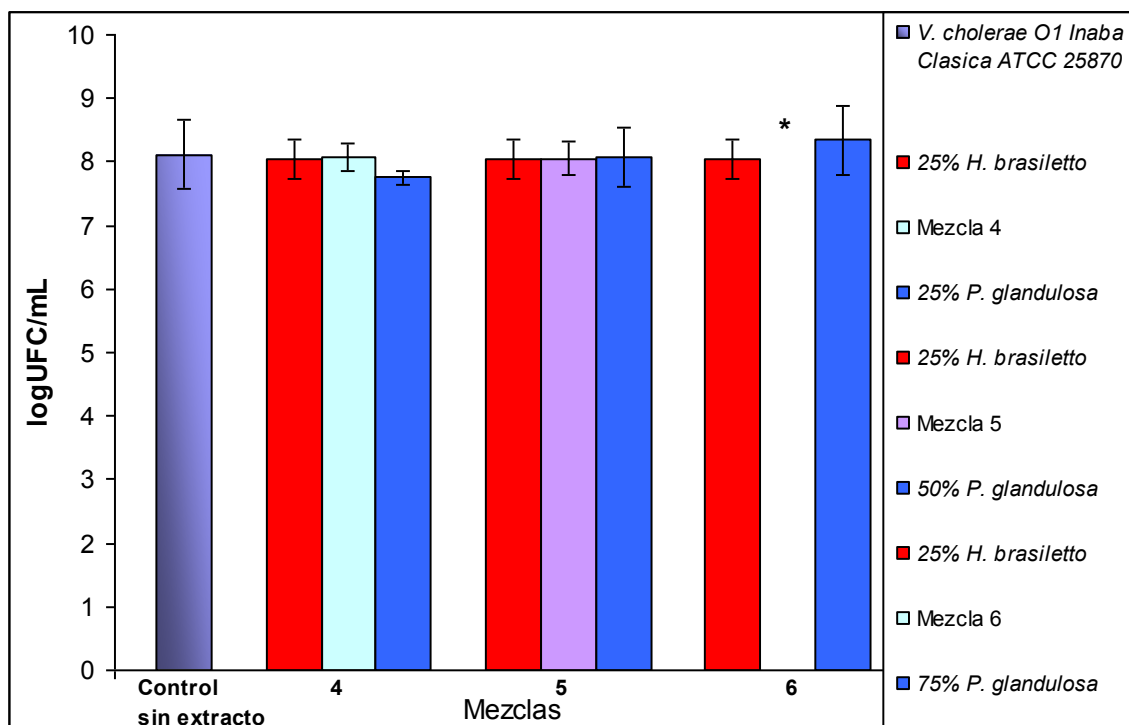


Figura 10. Determinación del efecto de mezclas de extractos *H. brasiletto*-*P. glandulosa* sobre el crecimiento de *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870). En estas mezclas la concentración de *H. brasiletto* 25% de la C.M.B. [0.15 mg/mL] se mantuvo constante, y la variación fue en la concentración de *P. glandulosa* usada.

* Estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Al exponer las mezclas 7, 8 y 9 (Ver Tabla 2) con el cultivo microbiano de *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870) no se observó una reducción en el crecimiento por la mezcla 7. En la Figura 11 se observa que las mezclas 8 y 9 mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al crecimiento de *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870) control. También la mezcla 8 es estadísticamente diferente ($p < 0.05$) a las concentraciones subletales del *H. brasiletto* (25%) y *P. fleuxicaule* (50%). De igual manera la mezcla 9 mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a la concentración subletal del *H. brasiletto* (25%), sin embargo no es estadísticamente significativo con la concentración subletal del *P. fleuxicaule* (75%).

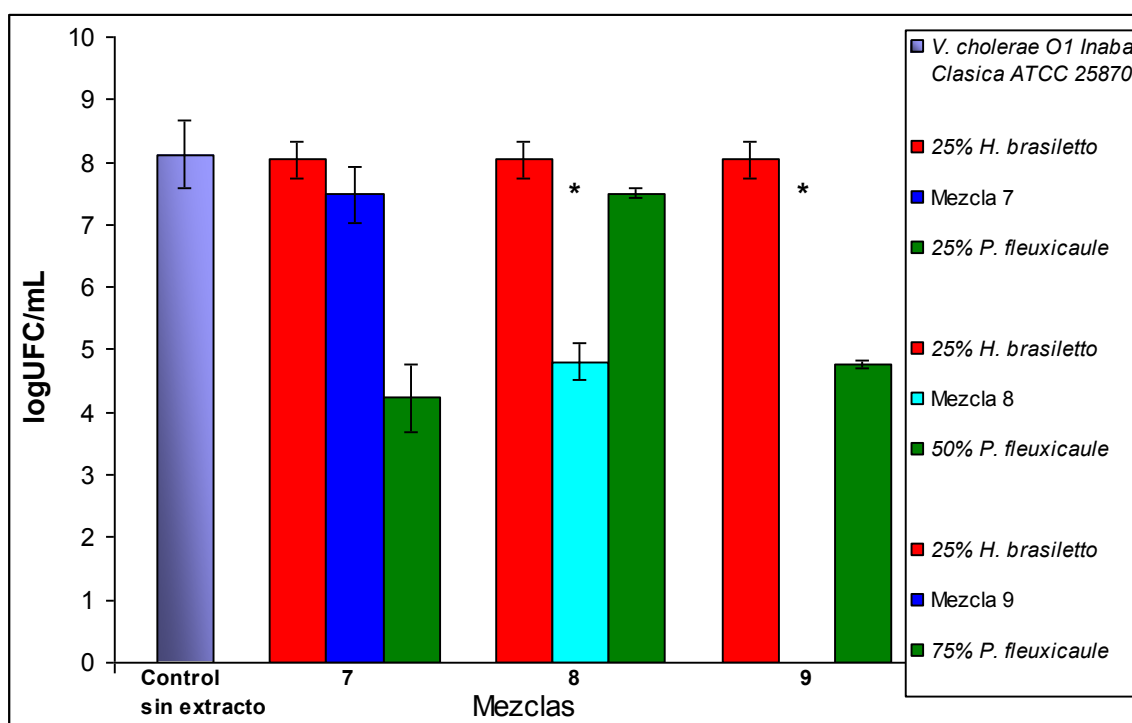


Figura 11. Determinación del efecto de mezclas de extractos *H. brasiletto*-*P. fleuxicaule* sobre el crecimiento de *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870). En estas mezclas la concentración de *H. brasiletto* 25% de la C.M.B. [0.15 mg/mL] se mantuvo constante, y la variación fue en la concentración de *P. fleuxicaule* usada. * Estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Las mezclas 10, 11 y 12 (Ver Tabla 2) no tuvieron efecto inhibitorio en el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837 (Figura 12).

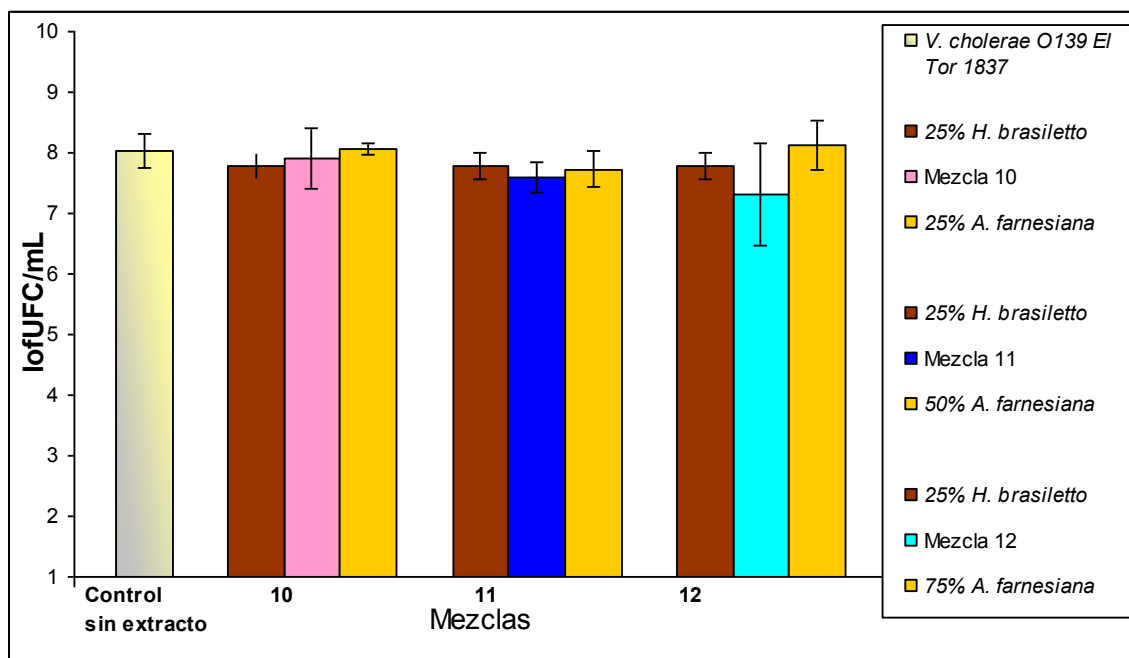


Figura 12. Determinación del efecto de mezclas de extractos *H. brasiletto*-*A. farnesiana* sobre el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837. En estas mezclas la concentración de *H. brasiletto* 25% de la C.M.B. [0.15 mg/mL] se mantuvo constante, y la variación fue en la concentración de *A. farnesiana* usada.

Las mezclas 13, 14 y 15 (Ver Tabla 2) al ser expuestos con el cultivo microbiano de *V. cholerae* O139 El Tor 1837 no mostraron reducción en el crecimiento por el tratamiento 13. Se observa en la Figura 13, que las mezclas 14 y 15 mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) respecto al crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837 (control). Sin embargo la mezcla 14 no tiene diferencia significativa respecto a las concentraciones subletales del *H. brasiletto* (25%) y *P. glandulosa* (50%). Por el contrario la mezcla 15 mostró diferencia significativa ($p<0.05$) respecto al 25% de la C.M.B. del *H. brasiletto* y el 50% de la C.M.B. del *P. glandulosa* (Figura 13).

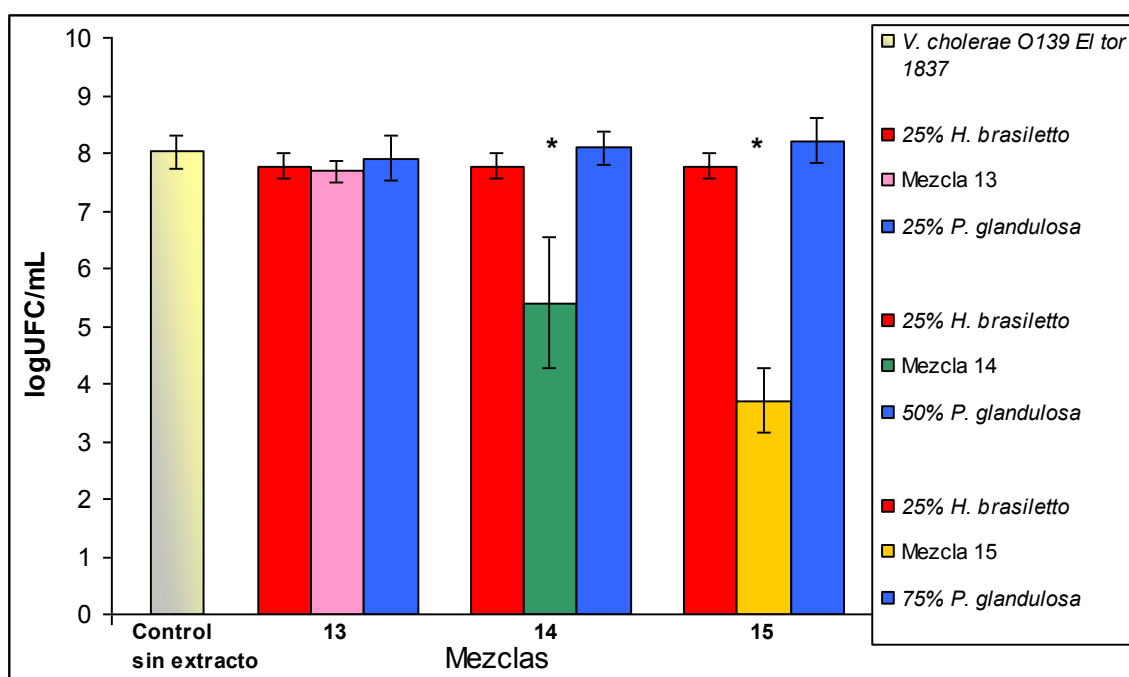


Figura 13. Determinación del efecto de mezclas de extractos *H. brasiletto*-*P. glandulosa* sobre el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837. En estas mezclas la concentración de *H. brasiletto* 25% de la C.M.B. [0.15 mg/mL] se mantuvo constante, y la variación fue en la concentración de *P. glandulosa* usada. *Estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

Al exponer las mezclas 16, 17 y 18 (Ver Tabla 2) con el cultivo microbiano de *V. cholerae* O139 El Tor 1837 no se observó una diferencia significativa en las mezclas 16 y 17 (Figura 14). De igual manera la mezcla 17 no tuvo diferencia significativa respecto a las concentraciones subletales del *H. brasiletto* (25%) y *P. fleuxicaule* (50%). Por el contrario en la Figura 10 se muestra que la mezcla 18 mostró diferencia significativa ($p<0.05$) respecto al crecimiento de *V. cholerae* 1837 (control), así como también con las concentraciones subinhibitorias del *H. brasiletto* (25%) y *P. glandulosa* (75%) usadas.

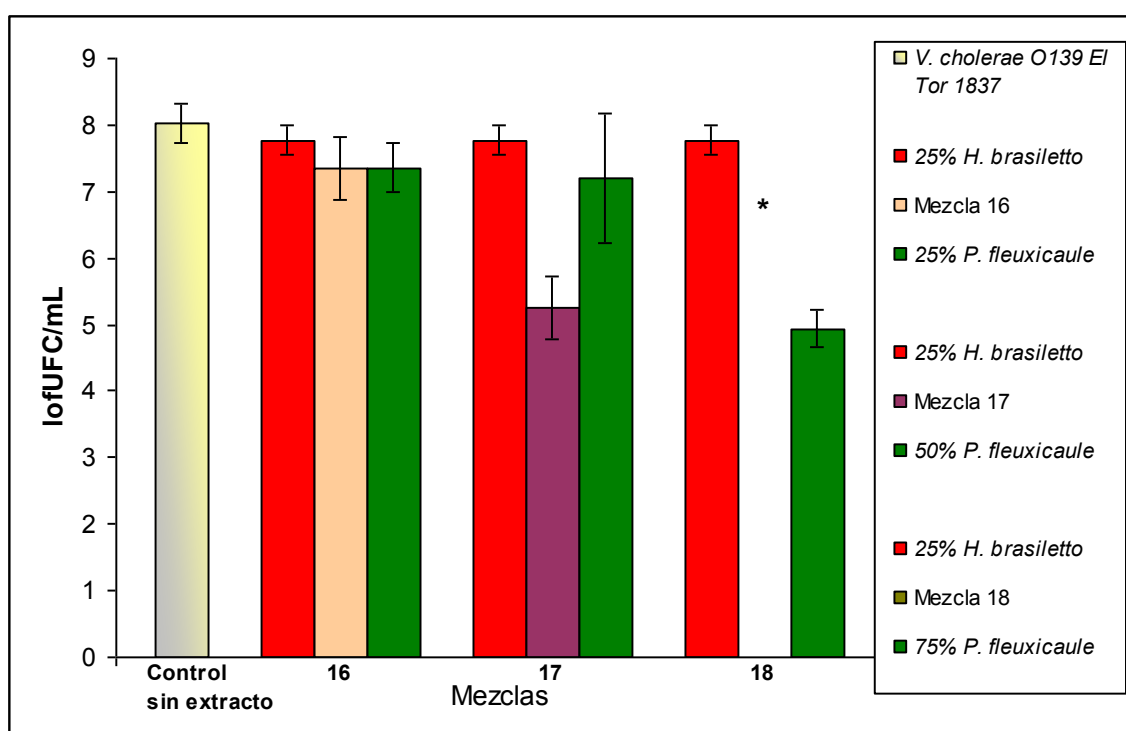


Figura 14. Determinación del efecto de mezclas de extractos *H. brasiletto*-*P. fleuxicaule* sobre el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837. En estas mezclas la concentración de *H. brasiletto* 25% de la C.M.B. [0.15 mg/mL] se mantuvo constante, y la variación fue en la concentración de *P. fleuxicaule* usada. *Estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

9.5 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (C.M.B.) de las mezclas de extractos de plantas

También se determinó la C.M.B. a cada una de las mezclas, sin embargo; en ninguno de las mezclas disminuyó significativamente la C.M.B. con respecto a los extractos utilizados individualmente. En las tablas 5, 6 y 7 se observó el efecto de los extractos y las mezclas en la cepa de *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).

Tabla 5.

Determinación de la C.M.B. de las mezclas de extractos de plantas y de los extractos individuales (*H. brasiletto*- *A. farneciana*) contra *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).

Extracto o Mezcla	<i>V. cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870). mg/mL
<i>H. brasiletto</i> (Palo de brasil)	0.67±0.26*
<i>A. farneciana</i> (Huizache)	7.33±2.88*
Mezcla 1 (25% <i>H. brasiletto</i> -25% <i>A. farnesiana</i>)	8.55±1.02*
Mezcla 2 (25% <i>H. brasiletto</i> -50% <i>A. farnesiana</i>)	8.22±1.55*
Mezcla 3 (25% <i>H. brasiletto</i> -75% <i>A. farnesiana</i>)	9.35±3.89*
*Desviación estándar	

Tabla 6.

Determinación de la C.M.B. de las mezclas de extractos de plantas y de los extractos individuales (*H. brasiletto*- *P. glandulosa*) contra *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).

Extracto o Mezcla	<i>V. cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870). mg/mL
<i>H. brasiletto</i> (Palo de brasil)	0.67±0.26*
<i>P. glandulosa</i> (Mezquite)	7.4±1.52*
Mezcla 4 (25% <i>H. brasiletto</i> -25% <i>P. glandulosa</i>)	6.32±1.97*
Mezcla 5 (25% <i>H. brasiletto</i> -50% <i>P. glandulosa</i>)	10.9±3.78*
Mezcla 6 (25% <i>H. brasiletto</i> -75% <i>P. glandulosa</i>)	10.45±2.33*
*Desviación estándar	

Tabla 7.

Determinación de la C.M.B. de las mezclas de extractos de plantas y de los extractos individuales (*H. brasiletto*- *P. fleuxicaule*) contra *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).

Extracto o Mezclas	<i>V. cholerae</i> O1 Inaba Clásica (ATCC 25870). mg/mL
<i>H. brasiletto</i> (Palo de brasil)	0.67±0.26*
<i>P. fleuxicaule</i> (Ébano)	15.4±0.89*
Mezcla 7 (25% <i>H. brasiletto</i> -25% <i>P. fleuxicaule</i>)	15.33±3.18*
Mezcla 8 (25% <i>H. brasiletto</i> -50% <i>P. fleuxicaule</i>)	17.0±3.18*
Mezcla 9 (25% <i>H. brasiletto</i> -75% <i>P. fleuxicaule</i>)	13.65±4.78*
*Desviación estándar	

En las tablas 8, 9 y 10 se observó el efecto de los extractos y las mezclas en la cepa de *V. cholerae* O139 El Tor 1837.

Tabla 8.

Determinación de la C.M.B. de las mezclas de extractos de plantas y de los extractos individuales (*H. brasiletto*- *A. farnesiana*) contra *V. cholerae* O139 El Tor 1837.

Extracto o Mezcla	C.M.B. en <i>V. cholerae</i> O139 El Tor 1837
<i>H. brasiletto</i> (Palo de brasil)	0.67±0.20 mg/mL
<i>A. farnesiana</i> (Huizache)	5.17±0.41 mg/mL
Mezcla 10 (25% <i>H. brasiletto</i> -25% <i>A. farnesiana</i>)	6.76±0.75 mg/mL
Mezcla 11 (25% <i>H. brasiletto</i> -50% <i>A. farnesiana</i>)	6.19±1.38 mg/mL
Mezcla 12 (25% <i>H. brasiletto</i> -75% <i>A. farnesiana</i>)	9.20±2.20 mg/mL
*Desviación estándar	

Tabla 9.

Determinación de la C.M.B. de las mezclas de extractos de plantas y de los extractos individuales (*H. brasiletto*- *P. glandulosa*) contra *V. cholerae* O139 El Tor 1837.

Extracto o Mezcla	C.M.B. en <i>V. cholerae</i> O139 El Tor 1837
<i>H. brasiletto</i> (Palo de brasil)	0.67±0.20 mg/mL
<i>P. glandulosa</i> (Mezquite)	10.0±0.89 mg/mL
Mezcla 13 (25% <i>H. brasiletto</i> -25% <i>P. glandulosa</i>)	7.06±2.16 mg/mL
Mezcla 14 (25% <i>H. brasiletto</i> -25% <i>P. glandulosa</i>)	18.02±4.31 mg/mL
Mezcla 15 (25% <i>H. brasiletto</i> -25% <i>P. glandulosa</i>)	17.9±10.44 mg/mL
*Desviación estándar	

Tabla 10.

Determinación de la C.M.B. de las mezclas de extractos de plantas y de los extractos individuales (*H. brasiletto*- *P. fleuxicaule*) contra *V. cholerae* O139 El Tor 1837.

Extracto o Mezcla	C.M.B. en <i>V. cholerae</i> O139 El Tor 1837
<i>H. brasiletto</i> (Palo de brasil)	0.67±0.20 mg/mL
<i>P. fleuxicaule</i> (Ébano)	15.6±0.89 mg/mL
Mezcla 16 (25% <i>H. brasiletto</i> -25% <i>P. fleuxicaule</i>)	16.2±0.0 mg/mL
Mezcla 17 (25% <i>H. brasiletto</i> -50% <i>P. fleuxicaule</i>)	17.22±3.25 mg/mL
Mezcla 18 (25% <i>H. brasiletto</i> -75% <i>P. fleuxicaule</i>)	10.53±2.04 mg/mL
*Desviación estándar	

9.6 Semipurificación de compuestos por Cromatografía líquida al vacío (VLC)

De las fracciones colectadas por la técnica VLC solo mostraron actividad antimicrobiana aquellas que fueron eluidas con la mezcla 9.5:0.5(v/v) de Cloroformo:Metanol.

9.7 Determinación de los grupos químicos en los extractos de plantas

Se encontraron diferentes grupos químicos en los extractos de las plantas (Tabla 11), se determinó que el *H. brasiletto* tiene presente flavonoides, carbohidratos, insaturaciones, p-benzoquinonas, cloruros, esteroides, saponinas, aldehídos, taninos y

esteres. En el extracto de *P. glandulosa* no se encontraron esteroides, saponinas, sesquiterpenlactonas, quinonas, alcoholes, ésteres. Se encontró que los extractos de *A. farnersiana* y *P. fleuxicaule* tienen presente los mismos grupos químicos: insaturaciones, carbohidratos, flavonoides, p-benzoquinonas, alcaloides, cloruros, aldehídos y taninos.

Tabla 11.

Determinación de los compuestos químicos en los extractos crudos de las plantas estudiadas.

	<i>H. brasiletto</i> (Palo brasil)	<i>P. glandulosa</i> (Mezquite)	<i>A. farnersiana</i> (Huizache)	<i>P. fleuxicaule</i> (Ébano)
Insaturaciones	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+
Carbohidratos	+	+	+	+
p-benzoquinonas	+	+	+	+
Coumarinas	-	+	-	+
Alcaloides	+	+	-	+
Cloruros	+	+	+	+
Esteroides y/o Saponinas	+	-	-	-
Sesquiterpenlactonas	-	-	-	-
Alcoholes	-	-	-	-
Aldehídos y cetonas	+	+	+	+
Hidrocarburo y éter aromático	+	+	-	-
Esteres	+	-	-	-
Taninos	+	+	+	+
+: Presencia -: No se detectó				

En los extractos semipurificados obtenidos de las fracciones en la mezcla 9.5:0.5 (v/v) cloroformo:metanol, se encontraron en *H. brasiletto* flavonoides, p-benzoquinonas, insaturaciones, cloruros, esteroides, taninos, saponinas (solamente 8 de los 11 encontrados en el extracto crudo). En el semipurificado del *P. glandulosa* dieron prueba positiva solo

3 de los 10 compuestos presentes en el extracto crudo; las coumarinas, p-benzoquinonas y cloruros (Tabla 12). En la fracción activa semipurificada de *P. fleuxicaule* se encontraron insaturaciones, cloruros, p-benzoquinonas y taninos; 4 de los 9 grupos químicos presentes en el extracto crudo.

En las mezclas semipurificadas con 9.5:0.5 (v/v) cloroformo:metanol solo se encontraron insaturaciones, flavonoides, p-benzoquinonas, cloruros, y saponinas en el extracto *H. brasiletto*-*P. glandulosa* 25%-50% (Tabla 12). En el caso de la mezcla 25%-75% dieron positivo los flavonoides, p-benzoquinonas, cloruros, saponinas y ésteres.

En la fracción activa semipurificada de la mezcla del extracto *H. brasiletto*-*P. fleuxicaule* 25%-50% se encontraron insaturaciones, flavonoides, p-benzoquinonas, cloruros, saponinas, ésteres y taninos. En la proporción 25%-75% de *H. brasiletto*-*P. fleuxicaule* se observaron p-benzoquinonas, insaturaciones, cloruros, ésteres y taninos (Tabla 12).

Tabla 12.

Determinación de los compuestos químicos en los extractos semipurificados con la mezcla 9.5:0.5 (v/v) de Cloroformo:Metanol.

	<i>H. brasiletto</i> (Palo brasil)	<i>P. glandulosa</i> (Mezquite)	<i>P. fleuxicaule</i> (Ébano)	<i>H. brasiletto</i> <i>P. glandulosa</i> 25%-50%*	<i>H. brasiletto</i> <i>P. glandulosa</i> 25%-75%*	<i>H. brasiletto</i> <i>P. fleuxicaule</i> 25%-50%*	<i>H. brasiletto</i> <i>P. fleuxicaule</i> 25%-75%*
Insaturaciones	+	-	+	+	-	+	+
Flavonoides	+	-	-	+	+	+	-
Carbohidratos	-	-	-	-	-	-	-
p-benzoquinonas	+	+	+	+	+	+	+
Coumarinas	-	+	-	-	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-
Cloruros	+	+	+	+	+	+	+
Esteroles y/o Saponinas	+	-	-	+	+	+	-
Sesquiterpenlactonas	-	-	-	-	-	-	-
Alcoholes	-	-	-	-	-	-	-
Aldehídos y cetonas	-	-	-	-	-	-	-
Hidrocarburo y éter aromático	+	-	-	-	-	-	-
Esteres	+	-	-	-	+	+	+
Taninos	+	-	+	-	-	+	+

+: Presencia, -: No se detectó, *Mezcla realizada y su proporción donde el *H. brasiletto* siempre fue 25%.

DISCUSIÓN

Desde tiempos muy remotos las plantas han sido fuente de alimentación, vestido, energía y medicina para el humano, con esto las plantas medicinales aun constituyen el recurso más conocido y accesible para grandes núcleos de la población mexicana. La Organización Mundial de la Salud reconoce el valor de esta práctica terapéutica y le otorga gran importancia en los esquemas o sistemas públicos para la salud (Huerta, 1997).

La validación del conocimiento empírico sobre la herbolaria indígena, particularmente la desarrollada por los aztecas en la época prehispánica, fue realizada por investigadores de la Universidad de Utah en 1975, basándose en la información registrada en documentos del siglo XVI.

Nuestros resultados mostraron que los extractos *H. brasiletto*, *A. farnesiana*, *P. fleuxicaule* y *P. glandulosa* fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Vibrio cholerae* O139 El Tor 1837 y *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870) tal como lo demostró Alarcón en el 2002.

Se obtuvo una C.M.B. con el extracto metanólico de *H. brasiletto* de 0.6 mg/mL para ambas cepas de *V. cholerae*, misma planta que reportaron García *et. al.* (2005) cuya C.M.B. fue de 4 mg/mL para *E. coli* O157:H7; por otra parte la C.M.B. de *A. farnesiana* fue de 7.3 mg/mL para *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870) y de 5.2 mg/mL para *Vibrio cholerae* O139 El Tor 1837, mismo efecto antimicrobiano encontrado para *C. perfringens* por Araiza en el 2001, por otro lado la C.M.B. obtenida por *P. glandulosa*

fue de 7.4 y 10 mg/mL respectivamente y con el extracto metanólico de *P. fleuxicaule* la C.M.B. fue de 15 mg/mL en los dos microorganismos en estudio.

Al realizar los ensayos para determinar el efecto subletal de la C.M.B. de cada uno de los extractos se observó que éstas no ejercieron disminución significativa sobre el crecimiento de nuestras cepas, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Alarcón (2002). Con la premisa que nuestros extractos en concentraciones subletales no inhiben el crecimiento de *V. cholerae* procedimos a la realización de las mezclas.

En dicho diseño optamos por utilizar el 25% de C.M.B. de *H. brasiletto* como base y mezclarlo con el 25, 50 y 75% de cada uno de los otros extractos, tal como fue reportado por Lin en el 2004 al realizar su investigación con extractos de orégano y arándano contra el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Al hacer la combinación de los extractos de *H. brasiletto* y *A. farnesiana*, utilizando las mezclas 1-3 y de la 10-12 (Ver tabla 2) éstas no presentaron disminución significativa en el crecimiento de *V. cholerae*, aún y cuando el extracto de *A. farnesiana* también mostró C.M.B. baja (5.2 y 7.3 mg/mL) en comparación con *P. glandulosa* y *P. fleuxicaule*. Al parecer en este caso se presentó un efecto antagónico, perdiendo la eficacia antimicrobiana uno o ambos extractos mezclados.

Las mezclas realizadas con extractos de *H. brasiletto* (25%) y *P. glandulosa* (25% y 50%) correspondientes a las mezclas 4 y 5 no mostraron disminución en el crecimiento de *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870). Aunque la mezcla 6, correspondiente al 25%:75% *H. brasiletto*:*P. glandulosa* mostró un efecto sinérgico. Estas proporciones 25%:75% también fue usada por Lin (2004) y encontró una inhibición sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*, sin embargo la mezcla se conformaba por Orégano y Arándano.

Los extractos mezclados del *H. brasiletto*-*P. fleuxicaule* en la proporción 25%-75% correspondiente a la mezcla 9 afectó por completo el crecimiento de *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870), mientras tanto, la mezcla 8 (25%-75%) disminuyó 3

logUFC/mL el crecimiento de la cepa, así como en reportes obtenidos por Ettayebi *et. al.* (2000) donde se redujo el crecimiento de *L. monocytogenes* al exponerse a una mezcla de nisina y timol.

Las mezclas 14 (25%:50%) y 15 (25%:75%) de extractos *H. brasiletto*-*P. glandulosa* disminuyeron significativamente el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837.

La mezcla 17 (25%-75%) solamente disminuyó 3 logUFC/mL el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837 y la mezcla 18 (25%-75%) de *H. brasiletto*- *P. fleuxiacule* eliminó completamente el crecimiento de la misma.

De esta forma, la combinación de 2 o mas compuestos antimicrobianos (Ricke, 2005) en bajas dosis pueden actuar de manera sinérgica. De acuerdo a nuestros resultados, cabe señalar que las mezclas que mostraron mejor efecto sinérgico al disminuir eficaz y totalmente el crecimiento de las cepas, fueron aquellas donde se mezcló el 25% de *H. brasiletto* con el 75% de otro extracto; ya sea *P. fleuxicaule* o *P. glandulosa*, proporción similar usada en los ensayos por Lin (2004).

Al realizar la determinación de la C.M.B. a las mezclas de los extractos se observó que ninguna mezcla disminuyó significativamente su concentración, aunque es importante mencionar que el efecto bactericida aún es mayor comparado con el extracto individual; es decir el utilizar el 25% de un extracto combinado con el 75 ó 50% de otro produce un mayor efecto bactericida que al utilizar el 100% de cada extracto individual.

Las plantas poseen una habilidad ilimitada para sintetizar compuestos, en su mayoría metabolitos secundarios, donde en muchos casos estas sustancias sirven como mecanismo de defensa de las plantas contra los predadores (insectos, herbívoros, microorganismos). Los compuestos químicos encontrados en nuestros extractos como en las mezclas en su mayoría fueron los flavonoides, taninos, carbohidratos, coumarinas y p-benzoquinonas; todos poseen diferentes propiedades y características. Algunos triterpenos, como la argentatina A; posee actividad antimicrobiana frente a *C. albicans*,

Klebsiella pneumoniae y *Pseudomonas aeruginosa*, siendo las últimas dos bacterias más sensibles a compuesto que al tratamiento de elección, en este caso el fluconazol (Martínez, 1994). Los fenoles y polifenoles son algunos de los fitoquímicos más simples y bioactivos, el sitio y número de grupos hidroxilos su estructura se ha relacionado con la inhibición de enzimas en los microorganismos por compuestos oxidados (Mason, 1987).

La actividad antimicrobiana de los flavonoides es debida probablemente a su habilidad para formar complejos con proteínas solubles y extracelulares, y por formar un complejo con las paredes celulares bacterianas, dando como consecuencia la ruptura de las membranas microbianas (Tsuchiya 1996).

Aunado a lo anterior algunos de los polifenoles presentes en las plantas han mostrado su capacidad de unirse a la toxina colérica, incluso formar complejos con sus subunidades separadas, interfiriendo con la internalización a células Vero, como lo demostró Morinaga *et. al* en el 2005.

Las quinonas son muy abundantes en la naturaleza, se han encontrado tanto en vegetales superiores como en hongos y bacterias. Dependiendo del grado de complejidad de su estructura química pueden clasificarse en benzoquinonas, naftoquinonas o antraquinonas (monocíclicas, bicíclicas o tricíclicas, respectivamente). Pueden presentar actividades farmacológicas de aplicación a la terapéutica, como es el caso de la juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) de las hojas y fruto del nogal (*Juglans regia* L., Juglandaceae) que presenta actividad antibacteriana y fungicida (Carretero, 2000). Las quinonas son responsables de la reacción de color café en los cortes o daños de frutas y vegetales y son un intermediario en la vía de síntesis de melanina en la piel humana. Su forma de acción es uniéndose a los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas, inactivándolas. Los blancos probables en la célula microbiana son las adhesinas expuestas a superficie, los polipéptidos de la pared celular y las enzimas unidas a membrana (Stern, 1996).

Taninos es un nombre de descripción general para un grupo de sustancias fenólicas poliméricas capaces de oscurecer la piel o precipitar la gelatina de una solución, una propiedad conocida como astringencia. Se encuentran en casi cualquier parte estructural de las plantas como ramas, hojas, raíces, tronco. Han recibido mayor atención desde que se sugirió que el consumo de bebidas conteniendo taninos (por ejemplo té verde o vino rojo) pudieran curar o prevenir varias enfermedades (Serafini, 1994).

Algunas cumarinas cuya propiedad antimicrobiana, ha sido utilizada para prevenir ocurrencias del virus del herpes humanos, (Berkada, 1978) el ácido hidroxicinámico (relacionado a cumarinas) ha mostrado actividad inhibitoria en bacterias gram positivas (Fernández, 1996). También las fitoalexinas (producidas en las zanahorias) poseen actividad antifúngica (Hoult 1996).

Es importante señalar que en nuestros extractos se encontraron diferentes compuestos químicos, como algunos mencionados anteriormente, entre los compuestos que están presentes en *H. brasiletto* podemos mencionar a los flavonoides, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, taninos. En *P. glandulosa* encontramos coumarinas, flavonoides, carbohidratos, taninos entre otros. En el extracto de *P. fleuxicaule* también están presentes los taninos, flavonoides, carbohidratos, coumarinas, etc. Por último en *A. farnesiana* observamos la presencia de taninos, flavonoides, carbohidratos, etc.

Nuestros datos mostraron que el realizar mezclas de diferentes extractos utilizando bajas concentraciones de ellos, resultaron efectivas para prevenir el crecimiento de *V. cholerae* siendo éste uno de los patógenos transmitidos por alimentos.

Por otro lado se demuestra la necesidad e importancia de realizar investigaciones para comprender el efecto entre extractos de plantas con la finalidad de prevenir enfermedades o de importancia para la industria alimentaria al utilizarlos como conservadores de alimentos.

CONCLUSIONES

Las plantas estudiadas mostraron actividad antimicrobiana contra el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837 y *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).

El extracto de *H. brasiletto* presentó la menor C.M.B. (0.6 mg/mL) en las cepas utilizadas. Seguido por el extracto de *A. farnesiana* que presentó una C.M.B. de 7.3 y 5.2 mg/mL para *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870) y *V. cholerae* O139 El Tor 1837, respectivamente. Por otro lado la C.M.B. del extracto de *P. glandulosa* fue de 7.4 y 10 mg/mL para las mismas cepas.

Las concentraciones menores de la C.B.M. de los extractos *H. brasiletto*, *A. farnesiana*, *P. fleuxicaule* y *P. glandulosa* no tuvieron un efecto estadísticamente significativo en el crecimiento de las cepas *V. cholerae* O139 El Tor 1837 y *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870)

Las Mezclas de *H. brasiletto*-*A. farnesiana* (Palo brasil-Huizache) no tuvieron efecto estadísticamente significativo en el crecimiento en las cepas de *V. cholerae*.

La mezcla de *H. brasiletto*-*P. fleuxicaule* (Palo brasil-Ebano) 25%-50% disminuyó 3 log UFC/mL el crecimiento de *V. cholerae* O1 Inaba Clásica 569-B (ATCC 25870).

Las mezclas de *H. brasiletto*-*P. fleuxicaule* (Palo brasil-Ébano) y *H. brasiletto*- *P. glandulosa* (Palo brasil-Mezquite) 25%-75% mostraron un efecto bactericida estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).

La mezcla de *H. brasiletto*-*P. fleuxicaule* (Palo brasil-Ebano) 25%-50% disminuyó 2 log UFC/mL el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837.

La mezcla de *H. brasiletto*-*P. fleuxicaule* (Palo brasil-Ebano) 25%-75% tuvo efecto bactericida estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en *V. cholerae* O139 El Tor 1837.

Las mezclas de *H. brasiletto*-*P. glandulosa* (Palo brasil-Mezquite) 25%-50% disminuyó 2 log UFC/mL y 25%-75% disminuyó 4 log UFC/mL el crecimiento de *V. cholerae* O139 El Tor 1837.

En la semipurificación de los compuestos presentes en los extractos, así como en las mezclas utilizadas, las fracciones obtenidas con los solventes 9.5:0.5 (v/v) de Cloroformo:Metanol fueron las que mostraron la actividad antimicrobiana contra *V. cholerae* O139 El Tor 1837 y *V. cholerae* O1 Inaba Clásica (ATCC 25870).

Los compuestos químicos que se encontraron en los extractos y las mezclas de los extractos, fueron en su mayoría flavonoides, instauraciones, coumarinas, carbohidratos, p-benzoquinonas, cloruros, taninos, aldehídos y cetonas.

LITERATURA CITADA

1. Alanis FG. 2002. *Ebano, Pithocellobium ebano (Berl.) Muller*. Árbol del noreste de México, apropiado para el áridopaisaje en ciudades del desierto y semidesierto de México. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.arbolesornamentales.com/ebano.htm> [Revisado 20 Marzo del 2004]
2. Alarcón FG. 2002. Efecto de extractos de plantas en el crecimiento, producción de toxina y la unión de *V. cholerae* a líneas celulares. Tesis de M.C. Microbiología, San Nicolás de los Garza, N.L. pp. 98
3. Alarcón FG. 2004. Inhibición del crecimiento, la producción de enterotoxina y la adhesión de *Vibrio cholerae* a células por extractos de *Haematoxylon brasiletto* (palo de Brasil). Concurso y encuentro Estatal de Salud Nuevo Leon 2003. Revista de Salud Pública y Nutrición. Edición especial 3 [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-3-2004/02.htm> [Revisado Enero 30 del 2004]
4. Andrews JM. 2001. BSAC standardized disc susceptibility testing method. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 48 S1 pp. 43-57
5. Araiza M. 2001. Efecto de extractos de plantas medicinales sobre el crecimiento, la producción de enterotoxina y la esporulación de *C. perfringens*. Tesis de M.C. Microbiología, San Nicolás de los Garza, N.L. pp. 63

6. Armstrong PW. 1992. Logwood and Brazilwood: Trees That Spawned 2 Nations.[Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://waynesword.palomar.edu/ecoph4.htm> [Revisado el 3 Julio del 2003]

7. Bennett V, O'Keefe E, Cuatrecasas P. 1975. Mechanism of action of cholera toxin and the mobile receptor theory of hormona receptor-adenylate cyclase interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 72 (1) pp. 33-37.

8. Bercada B., 1978. Preliminary report on warfarin for the treatment of herpes simplex. *J. Irish Colls. Phys Surg* 22 pp. 56.

9. Borroto RJ, Martinez PR. 2000. Geographical patterns of cholera in Mexico, 1991-1996. *International Journal of Epidemiology*. 29 pp. 764-772

10. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analitical Biochemistry*. 72 pp. 248-254.

11. Bucci LR. 2000. Selected herbals and human exercise performance. *Am J Clin Nutr*, 72 pp. 624S-36S.

12. Burt SA, Reinders RD. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letter in Applied Microbiology* 36(3) pp. 162-167

13. Cabello R. 1993. *Microbiología y Parasitología Humana*. 2ª ed., Panamericana.

14. Cañigüeral S, Vila R. 2000. *Fitoterapia: Concepto y Límites*. Fuentes de Información. [Internet] Herbal Hall. Disponible en el sitio de red: <http://www.crl.com/~robbee/herbal.html> [Revisado 16 Agosto del 2003]

15. Carretero M. 2000. Compuestos fenólicos: quinonas. Panorama actual med. 24 (236) pp. 778-782.
16. Center for Disease Control. 1991. Cholera-Peru 1991. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 40 pp. 108-110.
17. Colmer JA, Fralick JA, Hamood AN. 1998. Isolation and characterization of a putative multidrug resistance pump from *Vibrio cholerae*. Molecular Microbiology. 27(1) pp. 63-72.
18. Colwell RR. 2004. Infectious disease and environment: cholera as a paradigm for waterborne disease. International microbiology 7 pp. 284-289
19. Cutter C. 2000. Antimicrobial Effect of herbal extracts againsts *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *S. tiphymurium* associated with beef. Journal Food Protection 63 (5) pp. 601-607.
20. Díaz SJ. 1998. Aspectos clínico-epidemiológico de 60 casos de cólera atendidos en el Hospital Central Militar de 1991 a 1995. Rev. Sanid. Milit Mex. 52 (1) pp. 13-15.
21. Domínguez XA. 1988. Métodos de investigación fotoquímica, Ed. Limusa.
22. Doyle M, Beuchat L, Montville TE. 1997. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. ASM Press., pp. 768
23. Essawi T, Srour M, 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibactericidal activity. Journal Etnopharmacology 70 (3) pp. 343-349

24. Escobar M, 2001. Efecto de la actividad de extractos de plantas medicinales sobre el crecimiento, producción de verotoxinas y adhesión de *E. coli* O157:H7 sobre células HeLa. Tesis de M.C. Microbiología, San Nicolás de los Garza, N.L. pp. 54

25. Ettayebi K., Yamani JE., Rossi-Hassani BD., 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. FEMS microbiology letters. 183 pp. 191-195.

26. Fasano A, Baudry B, Pumplin DW, Wasserman SS., Tall BD., Ketley JM., Kaper JB. 1991. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. Proceedings of the National Academy of Sciences. 88 pp. 5242-5246.

27. Fernandez MA, Garcia MD, y Saenz MT. 1996. Antibacterial activity of the phenolic acids fraction of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. J. Ethnopharmacol. 53 pp. 11-14

28. Finkelstein RA. 1988. Cholera, the cholera enterotoxins, and the cholera enterotoxin-related enterotoxin family, In. Owen P, Foster TS (eds) Immunological and Molecular Genetic Analysis of Bacterial Pathogens. Elsevier, Amsterdam. pp. 85-102

29. Finley JW. 2004. Phenolic Antioxidants and Prevention of Chronic Inflammation. Foodtechnology 58, 11 pp. 42-46

30. Formal SB., Hale TL. y Sansonetti PJ. 1983. Invasive enteric pathogens. Infection Disease 5 pp. S702-S702.

31. García S, Alarcón G, Gómez M, Heredia N. 2005. *Haematoxylon brasiletto*. Extracts inhibit growth, enterotoxin production, and adhesion of *Vibrio cholerae*. Food Biotechnology. 19 pp. 15-19.

32. Goodwin TW. 1976. Chemistry and biochemistry of plant pigments, 2a. ed., 2 vols., Academic Press., N.Y.
33. Gutiérrez L, Del Río A, Valdespino JL, Rodríguez G, Sepúlveda J, Giono S. 1995. *Vibrio cholerae* 01 fenotipos y genotipos de México. Gaceta médica de México. 131(1) pp. 28-35
34. Henry JB. 2000. Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio. 9 ed. Masson.
35. Hernández L. 2001. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en cuba. Revista Cubana Plantas Medicinales (2) pp. 44-7.
36. Hiroshi O, Matsuura D, Miyake M, Ueno M, Takai I, Yamamoto T, Kubo M, Moss J, Noda M. 2002. Identification in tradicional herbal medications and confirmation by sintesis of factors that inhibit cholera toxin-induced fluid accumulation. Proceedings of the National Academy of Sciens. 99 (5) pp. 3042-3046.
37. Holmgren J, Lonnroth I, Mansson JE, Svennerholm L. 1975. Interaction of cholera toxin and membrana G_{M1} ganglioside of small intestine. Proceedings of the National Academy of Sciens. 72 (7) pp. 2520-2524.
38. Huerta Carlos. 1997. La herbolaria: Mito o realidad. BIODIVERSITAS. Año 3. Num 12. Abril. p 1-5
39. Houli JRS y Paya M. 1996. Pharmacological and Biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. Gen Pharmacol 27 pp. 713-722.

40. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. 2005. Modern Food Microbiology. 7th Edition. Springer. pp 661-663.
41. Kierek K, Watnick P. 2003. The *Vibrio cholerae* O139 O-antigen polysaccharide is essential for Ca²⁺-dependent biofilm development in sea water. Proceedings of the National Academy of Sciens. 100 (24) pp. 14357-14362
42. King A, Brown DFJ. 2001. Quality Assurance of antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion. Journal Antimicrobial of Chemoterapy. 48, S1 pp. 71-76.
43. Labbé R, García S. 2001. Guide to Foodborne Pathogens. John Wiley & Sons, Inc., pp 373.
44. Lachowicz KJ., Jones GP., Brigg DR., Bienvenu FE., Wan J., Wilcock A. and Coventry MJ. 1998. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. Letters in applied microbiology. 26 pp. 209-214
45. Leal R, Lira R, Martin C, Mañé M, Morales M, Novelo J, Vazquez C, Puerto F. 1998. Prevalencia de *Vibrio cholerae* entre los habitantes de una comunidad posterior a una epidemia de cólera en el estado de Yucatán, México. Rev. Biomed. 9(1) pp. 23-25
46. Lin Y., Labbe R. and Kalidas S. 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Fish and Meat Systems by Use of oregano and cranberry phytochemical synergies. Applied and environmental microbiology. Sept. Vol. 70 Num 9, pp 5672-5678.
47. Lozoya X. 1989. Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (willd.) poir. (Tepescohuite) I. Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. Arch Invest Med (Mex). 20(1) pp. 87-93

48. Marino M., Bersani C., Comi G. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection* 62 (9) pp. 1017-1023.
49. Martin KW, Edzard E. 2003. Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 pp. 241–246
50. Martínez V, Martínez R, Espinosa G, Días M, Herrera M. 1994. Antimicrobial properties of argentatina A, isolated from *Parthenium argentatum*. *Fitoterapia* 65 pp. 371-372
51. Mason TL, Wasserman BP. 1987. Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry* 26 pp. 2197-2202
52. McCaleb R., 2003. Las plantas del Nuevo Mundo., El Vegetariano. [Internet]. Disponible en el sitio de red : <http://www.ecoportat.com.ar/recetas/art/plantas.htm> [Revisado 15 Noviembre del 2003]
53. McCutcheon A., 1994. Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. *Journal Ethnopharmacology* 44 pp.157-169
54. Mekalanos JJ, Swartz, DJ, Pearson GD. 1983. Cholera toxin gene: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature (London)* 306 pp. 551-557.
55. Morinaga N, Iwamaru Y, Yahiro K, Tagashira M, Moss J, Noda M. 2005. Differential Activities of Plant Polyphenols on the Binding and Internalization of Cholera Toxin in Vero Cells. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 280, No. 24, Issue of June 17, pp. 23303–23309

56. Mueller M, Peña A. Derendorf H. 2004. Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill Curves versus MIC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 48, No. 2, pp. 369–377
57. Murphy M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4) pp. 564–582.
58. Nazer AI., Kobilinsky A., Tholozan JL., Dubois-Brissonnet F. 2005. Combinations of food antimicrobial at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect?. *Food microbiology* 22 pp. 391-398.
59. Nesper J, Schild S, Lauriano CM, Kraiss A, Klose KE, y Reidl JJ. 2002. Role of *Vibrio cholerae* O139 Surface Polysaccharides in Intestinal Colonization Infection and Immunity, Vol. 70, No. 11 pp. 5990–5996
60. Norma Oficial Mexicana NOM-016-SSA2-1994. Para la vigilancia, prevención, control, manejo y tratamiento del cólera. *Revista medica del IMSS*. 40(3) pp. 253-271, Secretaria de Salud 2002.
61. Ocampo R. 2002. Situación actual del comercio de plantas medicinales en América Latina. [Internet] *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales* 1(4):34-40. Disponible en el sitio de red: <http://www.ecodigital.com.ar> [Revisado el 28 de Abril del 2003]
62. Ocegueda S, Moreno E, Koleff P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas*. Num 12, Septiembre, pp. 12-15.
63. Ortega T. 2002. Plantas medicinales. [Internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.ondasalud.com/edicion/noticia/0,2458,48119,00.html> [Revisado el 15 de Marzo del 2003]

64. Persing D., Thomas S., Tenover F., White T. 1993. Molecular Diagnostic Microbiology. ASM, Washington. pp. 641
65. Plaeger Susan. 2003. Clinical Immunology and Traditional Herbal Medicines. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Vol. 10, No. 3 pp. 337–338
66. Punopas K, Eumkeb G, Chitsomboon B y Nakkiew P. 2003. The study of antibacterial activity of some medicinal plants in Lamiaceae family. Suranaree J. Sci. Technol. 11 pp. 52-59
67. Ray B. 2003. Fundamental Food Microbiology. 3th Edition. CRC Press. pp 398-401.
68. Reen FJ, Boyd EF. 2005. Molecular typing of epidemic and nonepidemic *Vibrio cholerae* isolates and differentiation of *V. cholerae* and *V. mimicus* isolates by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis. Journal of Applied Microbiology. 98 pp. 544-555.
69. Ricke SC., Kunding MM., Miller DR., Keeton JT. 2005. Alternatives to Antibiotics: Chemical and Physical Antimicrobial Interventions and Foodborne Pathogen Response. Poultry Science 84 pp. 667–675
70. Robres P, López-Velez R. 2002. Comentario: diagnostico del cólera. An Esp Pediatr 57(4) pp. 364-365.
71. Rojas A., Hernández L., Pereda R., Mata R. 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. Journal Ethnopharmacology 35 (3) pp. 275-283.
72. Sabeena F, Thirivikramji G, Radhakutty G, Indu P, Singh DV. 2001. In vitro susceptibility of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains associated with an

outbreak of cholera in Kerala, Southern India. *Journal of American Chemotherapy*. 47 pp. 357-368

73. Seas C, Miranda J, Gil AI, Leon R, Patz J, Huq A, Colwell RR, Sack RB. 2000. New insights on the emergence of cholera in Latin America during 1991: the Peruvian experience. *Am. J. Trop. Med.* 62(4) pp. 513-517.
74. Secretaria de Salud. 1992. Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica del cólera en México. Dirección General de Epidemiología. Semana 52.
75. Secretaria de Salud. 1993. Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica del cólera en México. Dirección General de Epidemiología. Semana 52.
76. Secretaria de Salud. 1994. Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica del cólera en México. Dirección General de Epidemiología. Semana 52.
77. Secretaria de Salud. 1995. Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica del cólera en México. Dirección General de Epidemiología. Semana 52.
78. Secretaria de Salud. 1996. Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica del cólera en México. Dirección General de Epidemiología. Semana 52.
79. Secretaria de Salud. 1997. Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica del cólera en México. Dirección General de Epidemiología. Semana 52.
80. Secretaria de Salud. 1998. Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica del cólera en México. Dirección General de Epidemiología. Semana 52.

81. Secretaría de Salud. 2001. Programa de Acción: Cólera. Primera Edición. ISBN 968-811-998-9.
82. Secretaría de Salud. 2001. Programa nacional de prevención y control del cólera 2001. Manual para la vigilancia epidemiológica del cólera en México. ISBN 968-811-773-0
83. Serafini MA, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. 1994. Red wine, tea and anti-oxidants. *Lancet* 344:626
84. Singh DV, Bhanumathi R, Colwell RR. 2004. Characterization of cholerae toxin gene-negative clinical strains of *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *Journal of Clinical Microbiology*. pp. 1381
85. Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against fine important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 26 pp. 118-122.
86. Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, y Lewis K. 2000. Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *PNAS* 97, 4 pp.1433–1437
87. Stern JL., Hagerman AE., Steinberg PD., Mason P.K. 1996. Phlorotannin-protein interactions. *J. Chem. Ecol.* 22 pp.1887-1899
88. Sun Y, Oliver JD, 1994. Antimicrobial action of some GRAS compounds against *Vibrio vulnificus*. *Food. Addit. Contam.* 11(5) pp. 549-558.
89. Tantillo GM, Fontanarosa M., Di Pinto, A., Musti, M. 2004. Update perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Letters in Applied Microbiology* 39 pp.117-126.

90. Tamplin ML., Honda T., Tsuji T., Miwatani T., Colwell RR. 1988. Evidence of common epitopes in the ganglioside binding site of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. FEMS Microbiology Letters. 49 pp. 7-11.

91. Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka T., Iinuma M. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of fitochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Ethnopharmacol. 50 pp. 27-34

92. Turnbull PC, Lee JV, Milliotis MD, Isaacson M, Ahmad Qs. 1985. In vitro and in vivo cholera toxin production by classical and El Tor isolates of *Vibrio cholerae*. Journal of Clinical Microbiology. 21(6) pp. 884-890.

93. Trucksis M, Galen JE, Michalski J, Fasano A, and Kaper JB. 1993. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. Proceedings of the National Academy of Sciences. 90 pp. 5267-5271

94. Valencia OC. 1995. Fundamentos de Fitoquímica. Trillas., pp 235.

95. Vilchis GAE, Uribe MS, Peres SPL. 1999. Características clínico-epidemiológicas de pacientes con cólera en la ciudad de México. Salud Pública de México. 41(6) pp.487-491.

96. Walsh SE, Maillard J.-Y., Russell A.D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L. y Bartolo R.G. 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. Journal of Applied Microbiology, 94 pp. 240-247

97. Weir E, Haider S. 2004. Cholera outbreaks continue. JAMC. 170 (7) pp. 1092-1093

98. Zamora, M. 1992. Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla y Veracruz, México. *Journal Ethnopharmacology* 35 (3) pp. 229-257.
99. Zhang X-H., Austin B. 2005. Haemolysins in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology*. 98 pp. 1011-1017.
100. Zhu J., Miller MB., Vance RE., Dziejman M., Bassler BL., Mekalanos JJ. 2001. Quorum sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99 (5) pp. 3129-3134.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Herlinda Fabiola Venegas García

Candidata para el Grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: CONTROL DEL CRECIMIENTO DE *Vibrio cholerae* POR PRODUCTOS NATURALES DE PLANTA

Campo de Estudio:

Fisiología de Microorganismos.

Biografía:

Datos personales: Nacida en Tampico, Tamaulipas el 23 de marzo de 1980, hija de Jacinto Venegas Pérez y Herlinda García Sáenz.

Educación:

Egresada de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2002.

Experiencia Profesional:

Análisis Clínicos, Análisis Microbiológico de Alimentos, Apoyo en Prácticas de Laboratorio de Microbiología.